

TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA  
DE FACTORES EXTERNOS EN LA  
MODIFICACIÓN DEL  
MICROBIOMA Y ESTADO  
NUTRICIONAL POBLACIONAL**

Paula Roca Saavedra

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INNOVACIÓN EN  
SEGURIDADE E TECNOLOXÍAS ALIMENTARIAS

LUGO 2017





# DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

**[Estudio de la influencia de factores  
externos en la modificación del microbioma y  
estado nutricional poblacional]**

Dña. Paula Roca Saavedra

Presento a miña tese, seguindo o procedemento adecuado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) No seu caso, na tese se fai referencia as colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide ca versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio de outros autores nin de traballos presentados por min para a obtención de outros títulos.

*En Lugo, 19 de Decembro de 2017*

Asdo.

Paula Roca  
Saavedra





## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

[Estudio de la influencia de factores  
externos en la modificación del microbioma y  
estado nutricional poblacional]

D. José Manuel Miranda López

Dña. Alejandra Cardelle Cobas

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dña. **Paula Roca Saavedra**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Lugo, 19 de Decembro de 2017*

Asdo.

José Manuel  
Miranda López

Asdo.

Alejandra  
Cardelle Cobas



## AGRADECIMIENTOS

Hace casi 4 años comenzaba una etapa en mi vida como estudiante, una etapa que consistía en subir algunos peldaños más, llenos de convivencia y de aprendizaje, que con la escritura de esta tesis y posterior lectura finaliza en este descansillo. Para que esto ocurriese, tengo que dar las gracias principalmente a mis directores de tesis al Dr. José Manuel Miranda López y Dra. Alejandra Cardelle Cobas, por el gran esfuerzo que hicieron en la enseñanza, por guiarme, por los ánimos y confianza mostrados en mí, por la constancia y hasta diría por la enorme paciencia que tuvieron durante este tiempo. Una gran suerte poder haber contado con dos personas como ellos que me dirigiesen este trabajo.

Quiero extender este agradecimiento a los demás profesores e investigadores del LHICA (Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos), así como al resto de compañeros. Especial mención al Dr. Alberto Cepeda Sáez, catedrático de la Universidad de Santiago, director del laboratorio y jefe del departamento, por mi inclusión en el mismo.

A Alicia Mondragón, compañera, amiga y confidente. Por su especial apoyo en todos estos años, por su disposición, por estar en los momentos más difíciles y porque sin ella esta convivencia no sería la misma, como tampoco lo serían las reuniones con su comida mexicana, la Thermomix, ni los conciertos.

A Carolina Nebot, compañera y amiga. Por amenizar las mañanas, siempre dispuesta a echar una mano, como también a dar su apoyo y

punto de vista en días grises, porque de no ser por su ayuda, aún hoy, estaría peleándome con el formato de este documento.

A María Veiga, compañera y amiga, agradezco su positividad, los momentos de café, las risas, e incluso compartir su deporte preferido, el rugby

El agradecimiento es también para mi compañero José Julio Porto por casi 11 años compartidos, porque subir con él, dio menos vértigo. Muchos instantes juntos como estudiante, pero también en los primeros contratos enfermeros y nutricionistas. Ojalá nos sigamos encontrando durante años y años.

Agradezco a mis amigos, ya que los días de desconexión también fueron necesarios, a Alba, Katy, Marcos, Iván, Jose, Clara, Tania, Sandra y Mary.

Por último, es preciso agradecer a mi familia, a mis padres, porque son el motor y apoyo de todos mis pasos, sin ellos, no sería posible prácticamente nada, ni con la total tranquilidad con la que subí estos peldaños. No puedo olvidar a mis abuelos, porque sé que están deseando que presente este proyecto. Y a Abel, este último año gracias a él, conocí lo que era una genial persona, la estabilidad emocional y el empujón que me faltaba.

Gracias.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

**AE:** Aceites Esenciales

**AF:** Ácido Fitánico

**ADI:** Ingesta Diaria Admisible

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**AGCC:** Ácidos Grasos de Cadena Corta

**AMACR:** Alfa - metilacil - CoA racemasa

**AP:** Ácido Pristánico

**ARNt:** Ácido Ribonucleico de transferente

**ARNr:** Ácido Ribonucleico ribosomal

**ATCC:** American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**ATPasa:** Adenosina Trifosfatasa

**BCCM:** Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (Colecciones coordinadas belgas de microorganismos)

**DA:** Dieta Atlántica

**DAr:** Dieta Ártica

**DASE:** Dieta Atlántica del Sur de Europa

**DMS:** Diferencia Mínima Significativa

**DSMZ:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen  
(Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)

**CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O:** Cloruro de Calcio Dihidratado

**CaCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O:** Cloruro de Calcio Hexahidratado

**CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo

**CLA:** Ácido Linoleico Conjugado

**CRD:** Cuestionario de Recogida de Datos

**Ct:** Ciclo Umbral

**Cys:** Cisteína

**EDs:** Agentes Emulsionantes

**E.E.U.U.:** Estados Unidos de América

**ESB-UCP:** Escola Superior de Biotecnología da Universidade Católica de Porto

**ESUB:** Extractos Secos procedentes de Uva Blanca

**ESUT:** Extractos Secos procedentes de Uva Tinta

**FAO:** Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

**FBR:** Ratio Firmicutes/Bacteroidetes

**FDA:** Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

**Hdac:** Histona desacetilasa

**HCL:** Ácido Clorhídrico

**HPLC:** Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

**IMC:** Índice de Masa Corporal



**KCl:** Cloruro de Potasio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de Potasio monobásico

**LMG:** Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie  
Universiteit Gent (Gante, Bélgica) (Colección de la Universidad de  
Gante de bacterias y microorganismos)

**LMR:** Límites Máximos de Residuos

**LNH:** Linfoma no Hodgkin

**MAPAMA:** Panel de Consumidores del Ministerio de Agricultura,  
Pesca, Alimentación y Medio Ambiente

**MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:** Sulfato de Magnesio Heptahidratado

**MI:** Microbiota Intestinal

**MRS:** De Man, Rogosa y Sharpe

**NaCl:** Cloruro de Sodio

**NB:** Caldo Nutritivo

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonato de Sodio

**NMEL:** Nivel de Dosis sin Efecto Microbiológico

**NNS:** Edulcorantes No Nutritivos

**NOEL:** Nivel sin Efecto Observable

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** Tampón Fosfato Salino

**PPAR:** Proliferador de Peroxisoma Activados los Receptores

**RCM:** Reinforced Clostridial Medium (Medio de Clostridium  
reforzado)

**RD:** Real Decreto

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

**SENC:** Sociedad Española de Nutrición Comunitaria

**SERGAS:** Servicio Gallego de Salud

**UE:** Unión Europea

**UFC:** Unidad Formadoras de Colonias

**USA:** Estados Unidos de América

**USC:** Universidad de Santiago de Compostela

**ZnO:** Monóxido de Zinc



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. MICROBIOTA INTESTINAL .....	6
1.1.1. Composición de la microbiota intestinal .....	7
1.1.2. Colonización y evolución de la microbiota intestinal.....	12
1.1.3. Relación de la microbiota humana con la obesidad.....	14
1.1.4. Factores que influyen y modifican la microbiota intestinal .....	17
1.1.4.1. Modulación de la microbiota intestinal a través de macronutrientes.....	18
1.1.4.2. Modulación de la microbiota intestinal a través de micronutrientes.....	20
1.1.4.3. Efectos de los aditivos alimentarios sobre la microbiota intestinal .....	23
1.1.4.4. Efectos de los antibióticos sobre la microbiota intestinal .....	26
1.2. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA VETERINARIA .....	30
1.2.1. Tetraciclinas .....	33
1.2.2. $\beta$ -lactámicos .....	35
1.2.3. Sulfamidas .....	36

1.2.4. Concentraciones de antibióticos según los límites máximos de residuos .....	38
1.2.5. Concentraciones de antibióticos que pueden estar presentes en la alimentación de un adulto según las recomendaciones nutricionales .....	42
1.3. HÁBITOS DIETÉTICOS GALLEGOS .....	46
1.3.1. Beneficios de la Dieta Atlántica del Sur de Europa.....	49
1.3.2. El ácido fitánico .....	50
1.3.3. Vía de degradación del fitol y síntesis del ácido fitánico ..	51
1.3.4. Metabolismo del ácido fitánico en los seres humanos.....	54
2. OBJETIVOS .....	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN Y ESTILO DE VIDA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PERSONAS DE LA POBLACIÓN GALLEGA .....	63
3.1.1. Sujetos participantes .....	63
3.1.2. Variables estudiadas.....	64
3.1.3. Recogida y tratamiento de las muestras de heces .....	67
3.1.4. Determinación y cuantificación bacteriana mediante PCR	68
3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO FITÁNICO EN LA SALUD DE LOS CONSUMIDORES EN EL MARCO DE LA DIETA ATLÁNTICA DEL SUR DE EUROPA .....	74
3.3. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS <i>IN VITRO</i> DE LOS ANTIBIÓTICOS A CONCENTRACIONES INCLUIDAS EN LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	75
3.3.1. Determinación de los efectos <i>in vitro</i> de los antibióticos sobre cultivos puros .....	76

3.3.2. Determinación de los efectos <i>in vitro</i> de los antibióticos sobre cultivos mixtos .....	83
3.3.2.1. Recolección de las muestras humanas de heces.....	83
3.3.2.2. Declaraciones éticas .....	84
3.3.2.3. Evaluación del crecimiento bacteriano en cultivos mixtos con muestras fecales humanas .....	84
3.3.2.4. Preparación de antibióticos .....	85
3.4. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	86
3.4.1. Animales de experimentación.....	86
3.4.2. Preparación de antibióticos .....	87
3.4.3. Recogida y tratamiento de las muestras de heces .....	88
3.5. ESTUDIO DE LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE UVA DE VINO BLANCO Y UVA DE VINO TINTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA .....	89
3.5.1. Sustratos empleados.....	89
3.5.2. Microorganismos y medios de cultivo empleados.....	90
3.5.3. Comprobación de la capacidad de fermentación de probióticos empleados .....	93
3.5.4. Procedimiento <i>in vitro</i> de fermentación colónica .....	94
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	95
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	99
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN Y ESTILO DE VIDA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PERSONAS DE LA POBLACIÓN GALLEGA .....	99

4.1.1. Caracterización de la población en estudio.....	99
4.1.2. Valoración de la ingesta dietética y grado de adhesión a la DASE .....	101
4.1.3. Valoración de la composición de la microbiota intestinal de los sujetos participantes .....	104
4.1.4. Composición de la microbiota intestinal en sujetos con diferentes IMC .....	106
4.1.5. Composición de microbiota intestinal en sujetos con diferente adherencia a la Dieta Atlántica del Sur de Europa .....	108
4.1.6. Composición de la microbiota intestinal en sujetos de diferente edad.....	109
4.2. CONSUMO DE ÁCIDO FITÁNICO Y SALUD HUMANA: RIESGOS, BENEFICIOS Y TENDENCIAS FUTURAS .....	111
4.2.1. Fuentes alimentarias de ácido fitánico.....	111
4.2.2. Modificación del contenido en ácido fitánico durante la producción de alimentos .....	115
4.2.3. Riesgos del consumo de ácido fitánico para la salud humana .....	117
4.2.4. Beneficios de la ingestión de ácido fitánico en la salud humana.....	121
4.2.5. Perspectivas de futuro y conclusiones .....	123
4.3. DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS EFECTOS DE NIVELES RESIDUALES DE ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA HUMANA MEDIANTE CULTIVOS PUROS .....	124
4.3.1. Evaluación <i>in vitro</i> de niveles residuales de tetraciclina en los alimentos sobre la microbiota intestinal humana mediante cultivos puros.....	124
4.3.2. Evaluación <i>in vitro</i> de niveles residuales de ampicilina en los alimentos sobre la microbiota intestinal humana mediante cultivos puros.....	126

4.3.3. Evaluación <i>in vitro</i> de niveles residuales de sulfadiacina en los alimentos sobre la microbiota intestinal humana mediante cultivos puros .....	128
4.4. DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS EFECTOS DE NIVELES RESIDUALES DE ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA HUMANA MEDIANTE CULTIVOS MIXTOS .....	129
4.4.1. Evolución <i>in vitro</i> de la microbiota intestinal humana sin adicción de antibiótico .....	130
4.4.2. Evolución <i>in vitro</i> de la microbiota intestinal humana con adicción de tetraciclina .....	132
4.4.3. Evolución <i>in vitro</i> de la microbiota intestinal humana con adicción de ampicilina .....	136
4.4.4. Evolución <i>in vitro</i> de la microbiota intestinal humana con adicción de sulfadiacina.....	138
4.5. DETERMINACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS EFECTOS DE LOS ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	141
4.5.1. Efectos de los antibióticos ensayados sobre la microbiota intestinal total.....	141
4.5.2. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Firmicutes .....	143
4.5.3. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Bacteroidetes.....	144
4.5.4. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Actinobacteria.....	147
4.5.5. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Proteobacteria .....	148
4.5.6. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el género <i>Bifidobacterium</i> .....	150

4.5.7. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el género <i>Lactobacillus</i> .....	152
4.6. DETERMINACIÓN DE LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE UVA DE VINO BLANCO Y UVA DE VINO TINTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA .....	154
4.6.1. Evaluación del crecimiento de los distintos grupos bacterianos en ensayos de fermentación <i>in vitro</i> con cultivos mixtos (inóculos fecales) .....	156
4.6.1.1. Evaluación del crecimiento de <i>Bifidobacterium</i> en ensayos de fermentación <i>in vitro</i> con cultivos mixtos .....	159
4.6.1.2. Evaluación del crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en ensayos de fermentación <i>in vitro</i> con cultivos mixtos.....	161
4.6.1.3. Evaluación del crecimiento de <i>Bacteroides</i> en ensayos de fermentación <i>in vitro</i> con cultivos mixtos.....	162
4.6.1.4. Evaluación del crecimiento de la microbiota total en ensayos de fermentación <i>in vitro</i> con cultivos mixtos .....	163
4.6.1.5. Evaluación del índice prebiótico en ensayos de fermentación <i>in vitro</i> con cultivos mixtos.....	164
5. CONCLUSIONES.....	169
6. BIBLIOGRAFÍA .....	173



## RESUMEN

En la actualidad, es un hecho aceptado la gran importancia que tiene llevar una alimentación adecuada en todas las etapas de nuestro ciclo vital para favorecer un óptimo crecimiento y desarrollo y ayudar al establecimiento de un correcto estado de salud durante toda nuestra vida. Además, también juega un papel fundamental en la prevención de numerosas enfermedades no transmisibles, como son la obesidad, de enfermedades metabólicas y enfermedades inflamatorias intestinales. Actualmente, estas enfermedades, forman parte de uno de los principales riesgos para la salud de la población. En consecuencia, conjuntamente con el incremento del envejecimiento de la población, constituye uno de los principales costes para los sistemas públicos de salud en los países occidentales, lo que pone en riesgo su viabilidad a largo plazo y por consiguiente, nuestro estado de bienestar.

Entre las distintas causas que favorecen el desarrollo de dichas enfermedades, en los últimos años se ha prestado mucha atención por parte de la comunidad científica a la influencia que tienen los distintos grupos bacterianos presentes en el intestino humano, denominado microbiota intestinal. En función de la predominancia de unos grupos bacterianos sobre otros, varía la capacidad de asimilación, metabolización y obtención de energía a partir de los nutrientes. De este modo, además de influir sobre el estado de salud de las personas en lo relativo a las enfermedades del tracto digestivo, estos grupos bacterianos también juegan un papel destacado en su estado nutricional.

El número de bacterias presentes a lo largo del aparato digestivo humano se va incrementando de modo continuo a partir del estómago,

llegando a alcanzar en la parte distal del colon humano una de las comunidades más densamente pobladas. Es precisamente en la región distal del colon donde dichas bacterias juegan un papel más relevante, y cuya población se ha estudiado en más profundidad en la última década. No obstante, todavía no se conoce del todo su función sobre la salud, lo que se refleja, por ejemplo, en que todavía en nuestros días no existe un consenso entre la comunidad científica de cómo debe ser la población bacteriana en condiciones óptimas para la salud del sujeto. Si existe en cambio consenso, en que cuanto mayor sea la diversidad en la microbiota intestinal, mayor efecto beneficioso puede tener en la prevención y el control de la obesidad y otras enfermedades crónicas no transmisibles.

A dicha diversidad, al igual que a su cantidad, pueden afectar un buen número de factores diferentes. Algunos de estos factores están directamente relacionados con los alimentos que ingerimos, a los que se conoce como factores dietéticos. No obstante, también existen otros factores, denominados no dietéticos, que pese a no depender del tipo de alimentos que ingerimos, también tienen la capacidad de influir sobre las bacterias intestinales. Entre los factores dietéticos, podemos enumerar el tipo, la calidad y cantidad de macro y micronutrientes que forman parte de nuestra dieta. En función de que en nuestra alimentación predominen proteínas, grasas o hidratos de carbono, estaremos favoreciendo que se multipliquen los grupos bacterianos que más adaptados están a la metabolización de los mismos. Asimismo, algunos micronutrientes, como pueden ser minerales, vitaminas o compuestos con actividad antioxidante y/o antimicrobiana, también tienen la capacidad de influir sobre la microbiota intestinal, pese a ser ingeridos en cantidades muy inferiores a los macronutrientes. También se incluyen como factores dietéticos, aquellos otros que, pese a no formar parte en sí de los alimentos, los tomamos a través de los mismos, ya que durante su proceso de producción y/o elaboración, son añadidos en forma de aditivos (de manera intencionada). Estas sustancias, si bien están presentes en cantidades extremadamente bajas, son muy activas, por lo que tienen la capacidad de alterar de un modo importante tanto

la diversidad de la microbiota intestinal como influir en su metabolismo.

Adicionalmente, además de aquellos factores que influyen tras su ingesta, también existen otros factores no dietéticos que pueden influir en la composición de la microbiota intestinal. Entre éstos, se ha demostrado en trabajos anteriores que juegan un papel muy importante la genética, el ambiente en el que se desenvuelva el individuo, el estrés al que esté sometido, la localización geográfica en la que vivamos, la edad del sujeto, el ejercicio físico que realice y si es un ejercicio de fondo o de fuerza, etc. Además, también podemos considerar dentro de este grupo a algunos agentes químicos, que tienen capacidad para modular la microbiota intestinal. Dentro de este grupo, podemos citar algunos pesticidas, insecticidas, y especialmente los fármacos. Existen multitud de fármacos, que cuando los tomamos, tienen efectos sobre la composición y la actividad de la microbiota intestinal. Dentro de ellos, se han descrito casos como por ejemplo algunos fármacos antidiabéticos, aunque con mucha diferencia, los que tienen una acción más directa y causan una mayor variación sobre la microbiota intestinal, son los antibióticos.

En los países desarrollados, los antibióticos son uno de los grupos farmacológicos más prescritos en medicina humana (especialmente en medicina pediátrica), motivo por el cual se ha prestado mucha atención a los efectos que éstos tienen sobre la microbiota intestinal cuando son administrados a las personas a dosis terapéuticas. De hecho, algunos autores han relacionado el notable incremento de la obesidad infantil en los países desarrollados con la elevada administración de antibióticos a los niños. No obstante, paradójicamente, los efectos sobre la microbiota intestinal que pueden ocasionar los antibióticos a bajas concentraciones han recibido muy poca atención. Este hecho es muy importante, ya que además de emplear los antibióticos para tratar las infecciones que tengamos en nuestro organismo, también ingerimos antibióticos a través de los alimentos, que son empleados en medicina veterinaria para tratar o prevenir infecciones en los animales productores de alimentos. Posteriormente, estos antibióticos pueden ser eliminados a través de

productos alimenticios (como la leche o el huevo), o bien permanecer en los tejidos animales (como la carne) que también empleamos como alimentos. De este modo, aún a dosis muy bajas, consumimos antibióticos de modo involuntario, que podrían tener efectos sobre nuestra microbiota intestinal.

Teniendo en cuenta todos los aspectos expuestos anteriormente, durante la presente tesis doctoral se han realizado varios ensayos, empleando metodologías destinadas a investigar los efectos de algunos componentes de nuestra dieta tanto en nuestra salud como en nuestra microbiota intestinal. De este modo, se ha realizado una caracterización previa de los sujetos a estudio, una valoración del estado nutricional de dichas personas, y se les han realizado encuestas epidemiológicas, a fin de determinar la influencia de algunos factores externos sobre la modificación de su microbiota, y por ende del microbioma. Además, también se ha procedido a la recogida y tratamiento de muestras fecales humanas, con el fin de analizar la composición de su microbiota. Adicionalmente, se han llevado a cabo estudios *in vitro* tanto con cultivos puros como con cultivos mixtos (muestras fecales) en un sistema que simula las condiciones del colon distal humano. Finalmente, también se han realizado ensayos *in vivo* con animales de experimentación, los cuales han sido en condiciones controladas expuestos a bajas concentraciones de antibióticos a través de su alimentación, con el fin de comprobar los efectos que dichos antibióticos tenían en su microbiota intestinal.

Mediante los estudios mencionados, se ha realizado una primera aproximación de la microbiota intestinal en muestras de sujetos que viven en la población gallega, dato de gran relevancia ya que era desconocido hasta la fecha. También se ha discutido si dicha microbiota intestinal en la población en estudio, varía en función de sus hábitos de consumo alimentario. El hecho de estudiar fundamentalmente la población gallega es debido fundamentalmente a la afinidad geográfica, y a que en esta región existen unas costumbres alimentarias tradicionales incluidas en el concepto de Dieta Atlántica, que en teoría, presentan características diferenciales con respecto al resto de España.

En base a los ensayos realizados, se ha podido concluir que la dieta y la microbiota intestinal de la población gallega es diferente a la de otras poblaciones, al menos en el grupo de sujetos incluidos en el estudio. Además, su alimentación muestra diferencias con respecto a los datos publicados a nivel nacional por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, como son un menor consumo de bebidas, un mayor consumo de frutas, hortalizas, leguminosas y pescado, y un menor consumo de productos de panadería, aperitivos y precocinados.

En función de los resultados obtenidos en las encuestas alimentarias, también se ha podido deducir en la población gallega la ingesta de una mayor cantidad de ácido fitánico. Dicho ácido es una molécula procedente de la clorofila, presente en alimentos producidos por animales rumiantes, especialmente cuando éstos se alimentan de pastos verdes, y en productos de la pesca, fundamentalmente en los más grasos. Esta molécula ejerce importantes efectos sobre la salud de las personas, que son discutidos en profundidad en este trabajo.

También se ha podido comprobar que la composición de la microbiota intestinal puede verse influida por la edad de los sujetos, ya que las personas de mayor edad mostraron una mayor cantidad de Proteobacteria y *Lactobacillus* spp. que el resto de los sujetos en estudio. Por otra parte, los sujetos con mayor adherencia a la Dieta Atlántica, mostraron una mayor cantidad de *Bifidobacterium* spp. en su microbiota intestinal, lo cual induce a pensar que la adherencia a dicha dieta también es capaz de modificar parcialmente la microbiota intestinal.

Otro de los aspectos que se tuvieron en cuenta en los ensayos realizados fue estudiar cómo los antibióticos ingeridos a través de los alimentos pueden afectar a largo plazo a las poblaciones bacterianas presentes en el intestino, aún estando éstos a bajas dosis y cumpliendo con los límites máximos de residuos permitidos por la legislación europea. Para ello, se emplearon tres de los antibióticos más usados en medicina veterinaria como son la tetraciclina, la ampicilina y la sulfadiacina, con los que se realizaron ensayos *in vitro* con cada uno de

ellos mediante cultivos puros, cultivos mixtos y ensayos *in vivo* en animales de experimentación.

En el primer ensayo realizado con cultivos puros, la tetraciclina fue capaz de modificar, aun a bajas dosis, la cantidad de bacterias de los géneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Clostridium perfringens*, disminuyendo dichos grupos bacterianos con respecto al grupo control. La ampicilina fue capaz de modificar el crecimiento en este caso de todas las cepas estudiadas a excepción del género *Bifidobacterium* spp. y de la especie *Enterobacter cloacae*, que se mantuvieron constantes tras la exposición a este antibiótico. En el caso de la sulfadiacina, su exposición ocasionó una disminución del crecimiento de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Clostridium perfringens*.

Una vez comprobado que en cultivos puros la exposición a los tres antibióticos seleccionados tenía efectos sobre dichos cultivos, se llevó a cabo un segundo ensayo, utilizando en este caso cultivos mixtos, empleando muestras de heces humanas. Para ello, se simuló *in vitro* la fermentación de la parte distal del colon durante un período de 24 h. Los resultados obtenidos mostraron que, en el caso de la tetraciclina, este antibiótico causó una disminución significativa en las poblaciones bacterianas pertenecientes al filo Bacteroidetes y al filo Actinobacteria, sin embargo, se encontró un incremento en la presencia de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. Con respecto a los resultados obtenidos tras la exposición a ampicilina, dicho antibiótico provocó un descenso significativo en el filo Bacteroidetes y un descenso significativo de los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. Con la aplicación de sulfadiacina, aumentó de manera significativa la cantidad de bacterias perteneciente al filo Firmicutes, el género *Bacteroides* sufrió un descenso, al mismo tiempo que provocó un significativo aumento en la presencia de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. en la microbiota intestinal.

En un tercer ensayo, se determinaron *in vivo* los efectos de los antibióticos estudiados en los dos casos anteriores sobre la microbiota

intestinal de animales de experimentación (ratones C57BL/6). Este ensayo tuvo una duración de 14 semanas, período durante el cual se recogieron muestras de heces de los animales semanalmente. Posteriormente, dichas muestras fueron procesadas y analizadas con el fin de comprobar la evolución de la microbiota intestinal durante este tiempo. Para este fin se determinó la presencia en dichas muestras de los filos principales que componen la microbiota colónica, así como dos géneros considerados beneficiosos para la salud del hospedador, como son el *Lactobacillus* spp. y *Bidobacterium* spp. En todos los casos, para observar de forma clara la evolución de la microbiota intestinal, se representaron cuatro semanas de todas las muestras, y una comparación de cada uno de los grupos que habían consumido antibiótico a dosis permitidas por la legislación en el pienso, con el grupo control sin adicción de ningún antibiótico.

Analizando los resultados obtenidos en este ensayo, se comprobó que la evolución de la microbiota intestinal de los ratones expuestos a antibióticos fue estadísticamente diferente a los controles en los tres antibióticos estudiados. En un principio, la exposición a antibiótico provocó un descenso significativo de la microbiota total, llegando dicho descenso hasta el octavo día de exposición. A partir de dicho día, los resultados obtenidos comenzaron a ser diferentes en función del antibiótico empleado.

Además, en función del filo o género bacteriano, también se ha podido comprobar que los antibióticos empleados ejercen efectos diferentes (y en algún caso, incluso antagónicos) sobre la población en estudio. De este modo, se pudo comprobar que la exposición a los tres tipos de antibióticos empleados provocó un incremento en la cantidad de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes con respecto al grupo control. Más extraño resultó el caso de las bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes, los cuales, si bien vieron modificada de modo significativo su evolución ante la exposición a los antibióticos, los efectos fueron diferentes. Así, en el caso de la tetraciclina y la ampicilina, su exposición provocó un descenso significativo en la cantidad de Bacteroidetes en la microbiota fecal, pero, sorpresivamente,



en el caso de la sulfadiacina, su exposición tuvo efectos opuestos, favoreciendo un incremento en la cantidad de Bacteroidetes en dicha microbiota. Tal y como se discute en esta tesis doctoral, no es ni mucho menos el primer trabajo en el que se encuentra que la exposición a un antibiótico provoca un incremento subsecuente de la cantidad de un grupo bacteriano concreto. Probablemente, el motivo de este comportamiento inesperado es que el antibiótico en cuestión ejerza un efecto más intenso sobre otros grupos bacterianos, provocando una reducción de los mismos y favoreciendo de este modo que aquellos grupos bacterianos que son menos sensibles a la acción del antibiótico ocupen el espacio que inicialmente ocupaban los grupos más sensibles.

Con respecto al filo Actinobacteria, los efectos de los tres tipos de antibióticos empleados fueron mucho menos evidentes que en los casos anteriores, ya que solo la sulfadiacina afectó a dicho grupo en los animales de experimentación expuestos al antibiótico con respecto a los controles, ocasionando un cambio significativo. Por el contrario, el filo Proteobacteria sí que se ha visto afectado en el caso de los tres antibióticos. Tradicionalmente, este filo es el que acumula más genes de resistencia a antibióticos, por lo que es perfectamente comprensible que, tras la exposición de los animales a los antibióticos, en los tres casos, la cantidad de Proteobacteria en su microbiota se incrementase con respecto a los controles. El mecanismo por el cual se produce este resultado es similar al ya explicado para el caso de los Bacteroidetes, aunque en este caso, los resultados son si cabe más evidentes al ser similares en los tres antibióticos.

Finalmente, también se analizó el efecto de los antibióticos sobre dos géneros que se consideran beneficiosos para la salud humana, hasta el punto de que son empleados habitualmente como probióticos, como son los géneros *Bifidobacterium* spp. y el *Lactobacillus* spp. En el caso del género *Bifidobacterium* spp., los tres antibióticos ensayados provocaron una reducción significativa de su presencia en la microbiota fecal. Con respecto a los resultados obtenidos referentes al género *Lactobacillus* spp., se producen descensos significativos tras la exposición a la tetraciclina y a la ampicilina pero no se encontró



variación alguna tras su exposición a la sulfadiacina. En la mayoría de los casos, como se puede comprobar, se ha producido una disminución y una variación en la presencia de estos dos géneros tras la exposición de un antibiótico, lo que acarrea efectos negativos para la salud de los sujetos.

Tal y como se explicó inicialmente, la modificación de poblaciones bacterianas puede también tener origen en la ingesta de algunos componentes minoritarios procedentes de alimentos que se consumen en una dieta. Estos efectos no siempre son en sentido negativo, sino que también existen algunos tipos de componentes de la dieta que tienen efectos positivos, como es el caso de la ingesta de polifenoles, provenientes por ejemplo del bagazo de la uva.

En el último ensayo de esta tesis doctoral, el objetivo fue determinar el comportamiento de los grupos bacterianos de la microbiota intestinal a fin de comprobar si extractos polifenólicos procedentes del bagazo de uva mostraban efectos prebióticos sobre la microbiota intestinal en modelo de fermentación *in vitro*. A este fin, se evaluó sobre todo si las bacterias pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. eran capaces de utilizar de manera selectiva sustratos de residuos de uva, tanto de uva tinta como blanca. Los resultados obtenidos demostraron que la concentración de *Bifidobacterium* spp. en los inóculos fecales durante el período de ensayo, en el caso control se mantiene constante. Sin embargo, en el caso de los ensayos realizados con los extractos secos de uva blanca y extractos secos de uva tinta, la concentración de *Bifidobacterium* spp. si se incrementó de manera significativa a lo largo del tiempo, mostrándose en ambos casos un crecimiento en dicha población, aunque siendo mayor la concentración de este género en el caso de la uva blanca. Con respecto al género *Lactobacillus* spp. en los ensayos control, no existieron diferencias significativas. En los ensayos realizados con extracto de uva tinta y blanca, si se pudo observar un incremento significativo de la concentración en el caso de la uva tinta y por el contrario no significativo en el caso de la uva blanca.

Una vez comprobado que hay cambios en el crecimiento de *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. cuando se utilizan los extractos obtenidos a partir de uva de vino blanco y de uva de vino tinto como fuente de carbono, se pasó a evaluar los cambios en la población de *Bacteroides* spp. Los resultados obtenidos mostraron que en el caso del ensayo control la concentración de *Bacteroides* spp. se mantuvo estable. Del mismo modo, en los ensayos en los cuales se les añadió tanto extractos de uva blanca como extractos de uva tinta, en ninguno de los casos se mostró una variación estadísticamente significativa en la población de este género bacteriano. Este resultado demostró que ambos extractos tuvieron una acción selectiva sobre los géneros bacterianos *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., por lo que si pueden considerados como prebióticos.



A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the full name 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

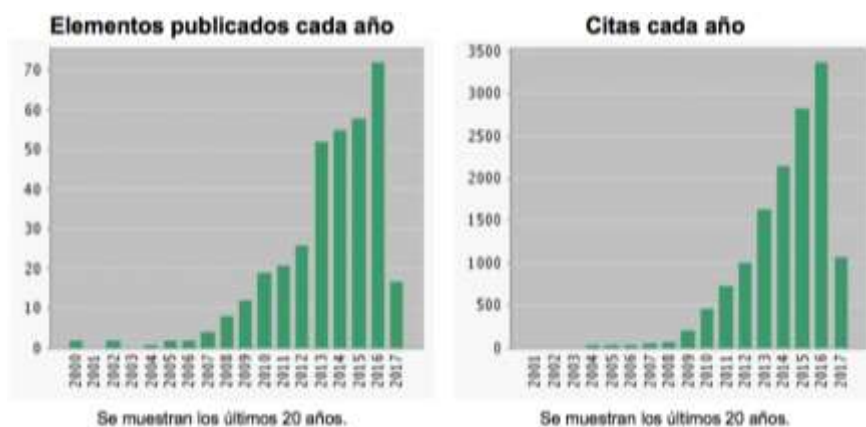
# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

Hasta la década de los años 80, el papel de la microbiota intestinal (MI) en la fisiología humana, se subestimó en gran medida por varias razones; en primer lugar, sólo una pequeña fracción de bacterias podían ser cultivadas mediante métodos microbiológicos convencionales, y por lo tanto el papel y la taxonomía de millones de bacterias eran desconocidas, y por otra parte, el interés en el papel metabólico de las bacterias se centraba principalmente en su potencial para fermentar nutrientes y producir toxinas dañinas. Como consecuencia, la investigación se dedicaba principalmente a abordar la forma de combatir estas bacterias (patógenas) para evitar infecciones responsables de graves enfermedades y evitar la mortalidad (Cresci y Bawden, 2016, Roberfroid y col., 2010, Saulnier y col., 2009). Por ello, tras el desarrollo de nuevas metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) y la secuenciación de alto rendimiento, principalmente de la región hipervariable del gen ARN ribosomal (ARNr) 16S, se ha podido dar un importante cualitativo en su conocimiento (Clemente y col., 2012; Pérez-Chanona y Trinchieri, 2016). Gracias a dichos métodos, hoy en día conocemos que hay aproximadamente 10 veces la cantidad de microorganismos dentro del tracto gastrointestinal de los seres humanos que células somáticas hay en el cuerpo (Cani y Everard, 2016; Conlon y Bird, 2015). Por esta razón, la MI juega un papel importante en la salud de los seres humanos. De hecho, a menudo muchos autores se refieren a ella como el "órgano olvidado" (Clemente y col., 2012).

Desde que De Filippo y col. (2010) publicase que la microbiota fecal de los niños de Burkina Faso (consumidores de dietas altas en fibra) mostrase diferencias muy importantes con relación de la microbiota fecal de los niños italianos (consumidores de una dieta con alto contenido de proteínas y azúcar), la investigación referente a la MI y su relación con la nutrición y la salud humana se ha incrementado de un modo espectacular (**Figura 1**).



**Figura 1. Incremento en la actividad investigadora respecto a la microbiota intestinal humana en el período 2000-2015. Fuente: ISI web of knowledge**

Su relación con la obesidad ha sido especialmente estudiada, ya que la obesidad es hoy en día una de las principales preocupaciones sanitarias a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) define el sobrepeso y la obesidad como índices de masa corporal (IMC) mayores o iguales a 25 y 30, respectivamente. Según datos de esta misma organización, en 2014, más de 1.900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. Además, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos.

Actualmente, es un hecho aceptado que la modulación de las poblaciones microbianas del intestino puede tener efectos beneficiosos en la prevención y el control de la obesidad, lo cual se ha explicado mediante diversos mecanismos. Quizás el más influyente sea la diferente capacidad de obtener energía a partir de los nutrientes ingeridos según la composición de la MI que tenga cada persona (Murphy y col., 2013). Sin embargo, hay muchos factores que pueden tener una influencia decisiva en la prevención y tratamiento de la obesidad así como en diversas enfermedades metabólicas, afectando de modo muy importante a la diversidad y al equilibrio de la MI. Algunos de los factores incluso no dietéticos que influyen, pueden ser el estrés, los viajes, la edad, el ejercicio, o las condiciones climáticas y otros factores influyentes dietéticos son los cambios en los hábitos alimentarios, la ingesta de alimentos funcionales específicos, la ingesta de probióticos y de prebióticos que tienen el potencial de influir favorablemente en el metabolismo de la MI, y por ende, del huésped.

Además, también se ha demostrado que algunos componentes minoritarios de los alimentos, así como ciertos aditivos alimentarios, contaminantes químicos y otros compuestos como los antibióticos son capaces de alterar de manera significativa tanto la diversidad de la MI como su metabolismo.

La presencia en el tracto gastrointestinal de algunos antibióticos, incluso a bajas concentraciones, ejerce una presión selectiva sobre la microbiota y ocasiona la selección de cepas resistentes a dichos antibióticos (Murphy y col., 2013; Wagner y col., 2008). Incluso en la Unión Europea, donde el uso de antibióticos está prohibido como promotores de crecimiento en la cría de animales de abasto, cuando se utilizan como agentes terapéuticos, cantidades residuales de estos medicamentos permanecen en los tejidos y alimentos de origen animal, siendo posteriormente ingeridos por los consumidores (Wagner y col., 2008). Este es un asunto de especial interés, ya que los organismos reguladores nacionales y las organizaciones internacionales de salud pública evalúan los potenciales riesgos para el consumidor de la ingesta de residuos mediante la evaluación de las propiedades químicas,

farmacológicas, toxicológicas, y antimicrobianas, pero sin tomar en cuenta sus efectos sobre la MI humana en lo referente a su relación con la nutrición (Joint FAO / OMS, 2002).

### **1.1. MICROBIOTA INTESTINAL**

El tubo digestivo constituye la principal superficie de intercambio y comunicación con el medio externo que tenemos en nuestro cuerpo. De hecho, la mucosa gastrointestinal en un ser humano adulto alcanza una superficie de 300 a 400 metros cuadrados (considerando toda la superficie, con las vellosidades desplegadas) y gracias a su estructura y funciones (receptores, sensores glándulas, secreciones...) reconoce de manera específica, sustancias desde el punto de vista analítico y bioquímico que transitan por el tracto gastrointestinal (Bourlioux y col., 2003).

Como resultado de ello, el ser humano obtiene dos importantes beneficios: *nutrición* por la digestión y absorción de nutrientes; y *defensa*, por el reconocimiento de sustancias extrañas y el desarrollo de sistemas de prevención y rechazo de posibles agresiones desde el medio externo. Sin embargo, hoy en día se conoce que estas funciones no dependen solo de la propia estructura del tubo digestivo si no que la presencia y actividad de comunidades microbianas que colonizan el intestino juega un papel muy importante para la homeostasis y equilibrio ambiental en el individuo (Bourlioux y col., 2003; Backhed y col., 2005).

El término **microflora** o **microbiota** se define como la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. La microbiota residente en el intestino humano es una de las comunidades más densamente pobladas (Ruiz Alvarez y col., 2012). Al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus



metabolitos se le denomina **microbioma**. El microbioma humano se refiere a la población total de microorganismos con sus genes y metabolitos que colonizan el cuerpo humano, incluyendo el tracto gastrointestinal, el genitourinario, la cavidad oral, la nasofaringe, el tracto respiratorio y la piel (Petrosino y col., 2009).

Uno de los aspectos que ha sido más estudiada la MI en los seres humanos, es su relación con la obesidad pero también se ha visto que juega un papel fundamental en diversas enfermedades derivadas de la misma (Lecomte y col., 2015). Se ha podido comprobar que influye de manera muy importante en la enteritis necrotizante (Kelly y col., 2012), en la diabetes (Quin y col., 2014), en el cáncer (Boleij y col., 2012), el síndrome metabólico (Wallace y col., 2011) y el hígado graso no alcohólico (Machado y Cortez-Pinto, 2012). Dicha MI interactúa también en el sistema inmune, proporcionando señales que promueven la maduración de varios tipos de células inmunes (principalmente linfocitos) (Cresci y Bawden., 2016) y el normal desarrollo de las funciones inmunes (Brown y Noelle, 2015; Devroka y col., 2012). En este contexto, las bacterias del intestino contribuyen a mantener la integridad del epitelio intestinal, promoviendo la reparación epitelial después de la lesión y desempeñando un papel importante en la regulación de la diferenciación de los enterocitos (Schipa y Conte, 2014). Además, las bacterias que forman parte de la MI producen un gran número de compuestos bioactivos, que pueden influir en la salud humana. Algunos de ellos (como las vitaminas sintetizadas en el colon) son beneficiosos, pero otros productos resultantes de su metabolismo son o pueden llegar a ser tóxicos (Conlon y Bird, 2015).

### 1.1.1. Composición de la microbiota intestinal

El número de células bacterianas presentes en el intestino humano se incrementa de modo continuo, pasando de entre  $10^1$  y  $10^3$  bacterias por gramo en el estómago y duodeno, a  $10^4$  a  $10^7$  bacterias por gramo en el yeyuno y el íleon, y culminando entre  $10^{11}$  y  $10^{13}$  en el colon,

especialmente en la parte distal del mismo (Abdou y col., 2016). La práctica totalidad de las bacterias que forman parte de la MI pertenecen entre 5 y 7 filos bacterianos, dependiendo del grado de diversidad que presente la persona. De modo general, la microbiota es más diversa en aquellas personas que viven en ambientes más rurales, y especialmente es mucho mayor en las poblaciones que siguen aún hoy en día con un estilo de vida cazador-recolector (Clemente y col., 2015). La mayor parte (alrededor del 90%) de las bacterias que forman parte de la MI en una persona adulta pertenecen a los filos Firmicutes y Bacteroidetes (Singh y col., 2016). Los Firmicutes (el filo predominante en las personas que viven en los países desarrollados) comprenden, en su mayoría, bacterias Gram-positivas con un ADN que tiene un bajo contenido de guanina y citosina, aunque también incluyen bacterias Gram-negativas. De entre este grupo, destacan especialmente dentro de la MI por su número y frecuencia los géneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus* (Power y col., 2014). Los Bacteroidetes incluyen bacterias Gram-negativas, que están representados principalmente por el género *Bacteroides* en el intestino humano, pero también incluyen otro género de importancia como es la *Prevotella* (Panda y col., 2014; Power y col., 2014). Las proporciones relativas de estos dos filos dominantes varían y pueden ser influenciados por diversos factores (Conlon y Bird, 2015). Otros filos, que son menos numerosos cuantitativamente pero también muy importantes cualitativamente, son las bacterias pertenecientes a los filos Cyanobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia, que están presentes en la MI de la gran mayoría de las personas adultas (Power y col., 2014; Pérez-Chanona y Trinchieri, 2016).

A nivel de género, los géneros *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium* son cuantitativamente los más importantes dentro de la MI y pueden representar más del 60% de las bacterias presentes en las heces humanas. No obstante, la proporción que alcanzan dentro del total de la MI es muy variable entre los diferentes individuos (Robles Alonso y Guarner, 2013; Conlon y Bird, 2015). Otros géneros que también tienen una gran relevancia, si bien

son menos numerosos con *Clostridium*, *Enterobacter* y *Streptococcus* (Conlon y Bird, 2015). Un análisis metagenómico (el estudio MetaHit) señaló que la MI de las personas se dividen en tres enterotipos, y que cada enterotipo estaba dominado por un género bacteriano diferente: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) y *Ruminococcus* (enterotipo 3) (Arumugam y col., 2011). Sin embargo, estudios posteriores entre los que se incluye el *Human Microbiome Project* (2012), han sido incapaces de confirmar dicho concepto (Huse y col., 2012), por lo que actualmente existe una importante controversia sobre si el enterotipo 3 está dominado por un único género o son en realidad varios géneros bacterianos taxonómicamente muy relacionados (Jeffery y col., 2012). Dado que las técnicas genéticas empleadas en la identificación y caracterización de dichos géneros bacterianos avanza de un modo vertiginoso, es muy probable que próximamente esta clasificación se modifique de un modo sustancial. En la **Tabla 1** podemos observar los principales filos bacterianos que componen la MI y los géneros principales que los componen.

**Tabla 1. Clasificación de filos y géneros bacterianos principales de la microbiota intestinal**

Dominio	Reino	Filo	Géneros
Bacteria	Bacteria	<b>Firmicutes</b>	<i>Clostridium</i>
			<i>Enterococcus</i>
			<i>Lactobacillus</i>
			<i>Ruminococcus</i>
			<i>Faecalibacterium</i>
			<i>Eubacterium</i>
			<i>Roseburia</i>
			<i>Streptococcus</i>
		<b>Bacteroidetes</b>	<i>Bacteroides</i>
			<i>Prevotella</i>
		<b>Actinobacteria</b>	<i>Bifidobacterium</i>
		<b>Proteobacteria</b>	<i>Escherichia</i>
			<i>Enterobacter</i>

La composición de la MI varía también de un modo muy importante dependiendo de la ubicación a lo largo del intestino y dependiendo de la profundidad axial (Gupta y col., 2016). Globalmente,

la masa microbiana que una persona adulta porta en su aparato digestivo representa aproximadamente un kilogramo de peso corporal y es esencial para numerosas funciones metabólicas (Pérez-Chanona y Trinchieri, 2016). En la **Figura 2** se muestra un esquema de dichas concentraciones crecientes, así como los géneros bacterianos que son predominantes en cada uno de los tramos del intestino.



**Figura 2. Variaciones de la microbiota a lo largo del aparato digestivo humano. Fuente: Abdou y col., 2016.**

A pesar de la intensa investigación que se ha venido realizando en la última década acerca de la MI y sus efectos sobre la salud humana, a día de hoy todavía no existe un consenso sobre qué características debe reunir una microbiota “saludable” (Conlon y Bird, 2016). Si existe consenso en el hecho de que ciertas fracciones de dicha microbiota están más relacionadas con la obesidad y algunos desórdenes metabólicos. De este modo, las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes están relacionadas con el metabolismo de nutrientes abundantes de origen animal como la grasa saturada y las proteínas (Le

Chatellier y col., 2013), mientras que las pertenecientes al filo Bacteroidetes están más relacionadas con la metabolización de hidratos de carbono complejos (Arumugam y col., 2011). Por dicho motivo, un incremento en la proporción de Firmicutes, combinada con una reducción en la proporción de Bacteroidetes, expresada normalmente mediante valores elevados del ratio Firmicutes/Bacteroidetes (FBR), se considera una microbiota obesogénica. Además, una elevada presencia de bacterias del filo Actinobacteria se ha relacionado con personas con mayor índice de masa corporal (IMC), por lo que se cree que dicho filo está relacionado con la obesidad (Arumugam y col., 2011). También se ha publicado que el filo Proteobacteria, que incluye gran parte de las bacterias que habitualmente son consideradas patógenos de origen alimentario, juegan un papel importante en el desarrollo de la inflamación crónica de baja intensidad en el colon, y por lo tanto también favorecen la ganancia de peso (Etxeberria y col., 2015).

Por el contrario, en relación con los grupos bacterianos que forman parte de una microbiota que se acerca más a lo considerado “saludable”, si existe consenso en que es mejor que dicha microbiota tenga una mayor cantidad y diversidad posible (Clemente y col., 2015). Así, diversos trabajos han demostrado que en aquellas comunidades que hoy en día siguen teniendo un patrón de alimentación del tipo cazador-recolector, como los Hadza en Tanzania o los Yanomani en la selva amazónica, sus microbiotas intestinales son mucho más diversas que en el resto de las poblaciones, y especialmente que en las personas que viven en ámbitos urbanos (Clemente y col., 2012).

Con respecto al uso de microorganismos considerados probióticos, aunque sus efectos se han demostrado con mucha mayor efectividad en el mantenimiento y potenciación de la inmunidad, algunos de ellos han demostrado tener cierto efecto en la prevención de la ganancia de peso. De este modo, Jung y col., (2013) demostraron en humanos que *Lactobacillus gasseri* consigue reducciones significativas en el peso corporal y en la circunferencia de la cintura tras 12 semanas de ingesta; Sánchez y col (2014) demostraron que *Lactobacillus rhamnosus* ayuda a reducir el peso corporal en mujeres tras 12 semanas de ingesta,

mientras que en hombres no tuvo efecto alguno. Sobre esta misma especie bacteriana, Luoto y col. (2010) publicaron que también es útil para ayudar a prevenir la ganancia de peso en niños con sobrepeso.

También se han relacionado con beneficios para la salud de los hospedadores algunas familias pertenecientes al filo Firmicutes, tales como Erysipelotrichaceae, Ruminococcaceae, Eubacteriaceae y Lachnospiraceae (Jones y col., 2014) y algunos géneros pertenecientes a diversos filos como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* de los clusters XIVa/IV, *Eubacterium* o *Roseburia*. A nivel de especie, tres especies hasta hace poco prácticamente desconocidas como *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* o *Roseburia intestinalis*, han demostrado que previenen trastornos como la obesidad o la diabetes, así como a la contribución y mejora de la inmunidad y el estado inflamatorio (Guinane y Cotter, 2013 Hollister y col., 2014; Jones y col., 2014; Gupta y col., 2016).

### 1.1.2. Colonización y evolución de la microbiota intestinal

Estudios recientes han publicado que la colonización del tracto digestivo por microorganismos se inicia a lo largo del curso del desarrollo fetal y continúa a partir de ese momento de manera acelerada (Endo y col., 2014, Human Microbiome Project Consortium, 2012; Huse y col., 2012). En este sentido, hoy en día conocemos que el meconio de los recién nacidos prematuros no es estéril, y presenta una composición de la microbiota diferente de la adquirida después de la primera semana de vida, lo que demuestra que durante la etapa final se produce una temprana colonización del intestino (Cresci y Bawden, 2015).

A partir del nacimiento, la MI se desarrolla rápidamente y se produce una sucesiva incorporación de diferentes especies bacterianas a la misma, dependiendo de factores tanto dependientes del huésped como ambientales (Johnson y Versalovic, 2012).

La diversidad de la MI en el lactante es inicialmente muy baja, y está formada principalmente por microorganismos aerotolerantes, ya que el intestino contiene inicialmente oxígeno (Endo y col., 2014). No obstante, estos microorganismos aerotolerantes, después del nacimiento, son reemplazados por microorganismos anaerobios, que son típicos de la MI del adulto (Cresci y Bawden, 2015). Este reemplazo se va produciendo de un modo paulatino, alcanzando hacia los 6 meses de edad del sujeto, una composición relativamente similar a que mantendrá durante el resto de la etapa infantil (Endo y col., 2014). A esta edad, uno de los factores más importantes que contribuyen a la formación de la MI es el tipo de lactancia (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Johns y col., 2014). La leche materna proporciona unos 1.010 microbios por litro (Cresci y Bawden, 2015; Johns y col., 2014), conteniendo hasta 600 especies diferentes de bacterias, incluyendo *Bifidobacterium* beneficiosos tales como *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium dentium*, así como *Lactobacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. (Cresci y Bawden, 2015). Además, los oligosacáridos presentes en la leche materna son polímeros digeribles formados por un pequeño número de diferentes monosacáridos que sirven como prebióticos, estimulando el crecimiento selectivo de los miembros del género *Bifidobacterium* (Cresci y Bawden, 2015). Por el contrario, los bebés alimentados con fórmulas farmacéuticas no reciben una composición bacteriana tan variada y en su intestino se induce la formación de una MI que contiene taxones bacterianos como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterobacter* y *Enterococcus*, lo que distingue significativamente a los bebés alimentados con fórmula de los alimentados con leche materna (Johns y col., 2014).

La composición bacteriana comienza a converger hacia una microbiota adulta hacia el final del primer año de vida y se asemeja totalmente a la microbiota del adulto entre los 2,5 y 3 años (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Koenig y col., 2011). A dicha edad, la MI dominada por el género *Bifidobacterium* cambia hacia otra dominada por bacterias de los filos Bacteroidetes y Firmicutes, más



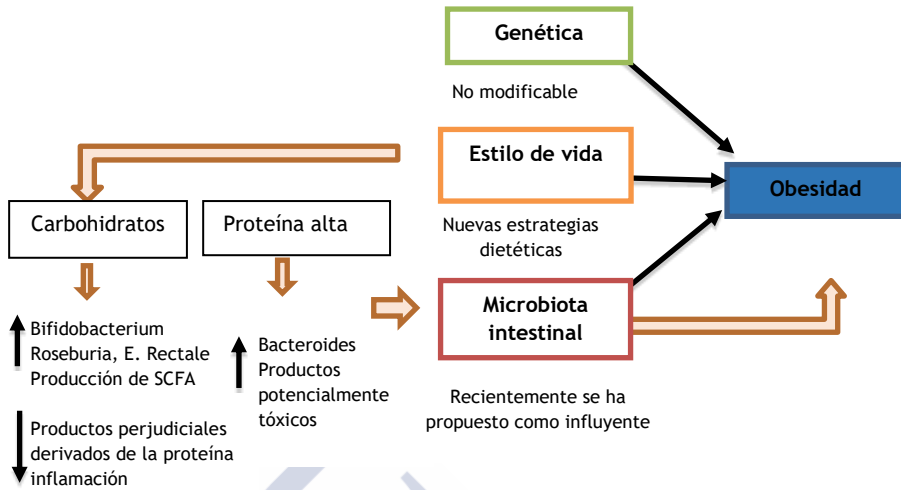
propias del adulto, que a partir de ese momento variará dependiendo de numerosos factores que pueden ocurrir en la vida de cada persona (Arumugan y col., 2011; Human Microbiome Project Consortium, 2012; Tan y O'Toole, 2015; Gupta y col., 2016).

Una vez que la microbiota ha alcanzado la madurez, permanece a grandes rasgos estable hasta la vejez, aunque se pueden encontrar algunas diferencias en la microbiota de los ancianos con respecto a la de los adultos jóvenes (Le Chatellier y col., 2013). Particularmente, el filo Bacteroidetes y el género *Clostridium* predominan en la microbiota de las personas mayores en comparación con las proporciones más altas de Firmicutes en adultos jóvenes (Johns y col., 2014). También se observa que las personas mayores tienen disminuciones significativas en *Bifidobacterium* (Johns y col., 2014). Los adultos jóvenes tienen más variabilidad en la composición bacteriana que en la edad avanzada y varían mucho entre los individuos, variando de 3 a 92% para Bacteroidetes y 7 a 94% para Firmicutes. Algunos autores han apuntado la posibilidad de que dichas variaciones podrían estar relacionadas con la mayor gama de morbilidades asociadas con la tercera edad y el uso posterior de medicamentos para su tratamiento (Claesson y col., 2011; Clemente y col., 2012).

### 1.1.3. Relación de la microbiota humana con la obesidad

La OMS define el sobrepeso y la obesidad como “una anormal o excesiva acumulación de grasa que puede dañar la salud” (OMS, 2016). La obesidad es un trastorno caracterizado por deposición excesiva del tejido adiposo, una pandemia que se ha convertido en un importante problema de salud pública (Wu y col., 2015). Estudios recientes sugieren que la variación en nuestro "órgano olvidado" puede tener un papel más influyente que el propio genoma humano en la patogénesis de la obesidad debido a su interacción directa con los factores ambientales (Le Chatellier y col., 2013) (**Figura 3**).





**Figura 3. Factores que actúan sobre la obesidad. Fuente: López Legarrea y col., 2014**

Estudios recientes han demostrado que las personas obesas presentan, a grandes rasgos, una menor riqueza de especies y géneros bacterianos en su microbiota fecal (Le Chatellier y col., 2013). Además, de ser menos diversa, dicha MI en las personas obesas suele mostrar una elevada relación del ratio Firmicutes/Bacteroidetes y tiene por lo tanto, una mayor capacidad para la extracción de energía a partir de la ingesta alimentaria (Gupta y col., 2016). Además, también se ha publicado una mayor proporción de bacterias del filo Actinobacteria en la MI de individuos obesos (Le Chatellier y col., 2013), así como una menor diversidad en el microbioma de los adultos obesos con respecto a los no obesos (Le Chatellier y col., 2013; Cotillard y col., 2013). Esta diferencia en el microbioma es importante, ya que por ejemplo los Firmicutes, tras la expresión génica de su microbioma, codifican más enzimas para la digestión de hidratos de carbono que los Bacteroidetes (El Kaoutari y col., 2013). Por dicho motivo, la MI de las personas obesas podría tener la capacidad de generar más energía a partir de los alimentos ingeridos en comparación con la MI de las personas con

normopeso. Asimismo, también se ha señalado que los individuos obesos tienen una mayor abundancia de los genes implicados en la producción de hidrógeno y metano, y una menor abundancia de los genes asociados con la producción de sulfuro de hidrógeno (Le Chatellier y col., 2013). Además, los mismos genes también pueden ser responsables de que la producción de ácidos grasos de cadena corta, (AGCC) (principalmente acetato, butirato y propionato) a partir de carbohidratos complejos (polisacáridos) y ciertos aminoácidos por la microbiota del colon sea mayor en individuos obesos (Abdou y col., 2016). De este modo, en dichos individuos se produce una mayor extracción de calorías y glucosa a partir de los alimentos y la absorción de glucosa de la dieta (Lin y col., 2013; Abdou y col., 2016). Investigaciones anteriores demostraron que la concentración de AGCC es un 20% mayor en los adultos obesos y con sobrepeso que en los adultos con normopeso, en ambos casos llevando una dieta de tipo occidental (Abdou y col., 2016). Para las personas que viven en los países desarrollados, los AGCC producidos en el colon contribuyen aproximadamente el 5-10% de los requerimientos energéticos diarios (Abdou y col., 2016). Esta proporción sobre la ingesta podría ser aún mayor en las zonas del mundo donde se consume más fibra dietética, como África (Abdou y col., 2016).

Con respecto a la modificación de la MI en pacientes sometidos a dietas restrictivas, Cotillard y col. (2013) demostraron que una dieta hipocalórica puede aumentar la diversidad de la MI hasta un 25%, pero sólo en el caso de sujetos portadores con una microbiota con baja diversidad. También encontraron que la restricción dietética en los individuos con alta densidad de genes en términos de pérdida de peso corporal mejora la sensibilidad a la insulina, y la disminución de la inflamación. Esta hipótesis implica, desde un punto de vista conceptual, que la composición de la MI y la riqueza de genes pueden ser utilizados como factores predictivos para determinar la eficacia de una futura intervención dietética (Cotillard y col., 2013; Cani y Everard, 2016). Los seres humanos obesos y delgados difieren en las composiciones de la MI, lo que indica que los diferentes grupos bacterianos están específicamente relacionados con la obesidad (Cox y col., 2014). En

este sentido, algunos trabajos previos en ratones han demostrado que una adecuada cantidad de bacterias beneficiosas en la MI, como los *Lactobacillus* spp., son capaces de interrumpir o disminuir el ritmo de progresión de algunos trastornos metabólicos, incluyendo la obesidad (Poutahidis y col., 2014; Varian y col., 2014). Por este motivo, la terapia de la obesidad mediante agentes probióticos o estimulando el crecimiento de algunos tipos de especies y géneros bacterianos no cultivables, es una perspectiva realista a medio plazo y que cobrará un mayor protagonismo en los próximos años.

### **1.1.4. Factores que influyen y modifican la microbiota intestinal**

Dentro de los numerosos factores que se ha evidenciado que pueden ejercer un efecto significativo, capaz de causar modificaciones importantes en la composición de la MI, se encuentran los factores no dietéticos, dietéticos y muy especialmente, componentes minoritarios de los alimentos y el empleo de antibióticos, cuyo efecto es capaz de originar modificaciones muy bruscas (Derriem y van Hylckama Vlieg, 2015; Escobar y col., 2015; Nicholson y col., 2010). En la **Figura 4** se muestra qué factores pueden dar lugar a una simbiosis o disbiosis de la composición de la microbiota.

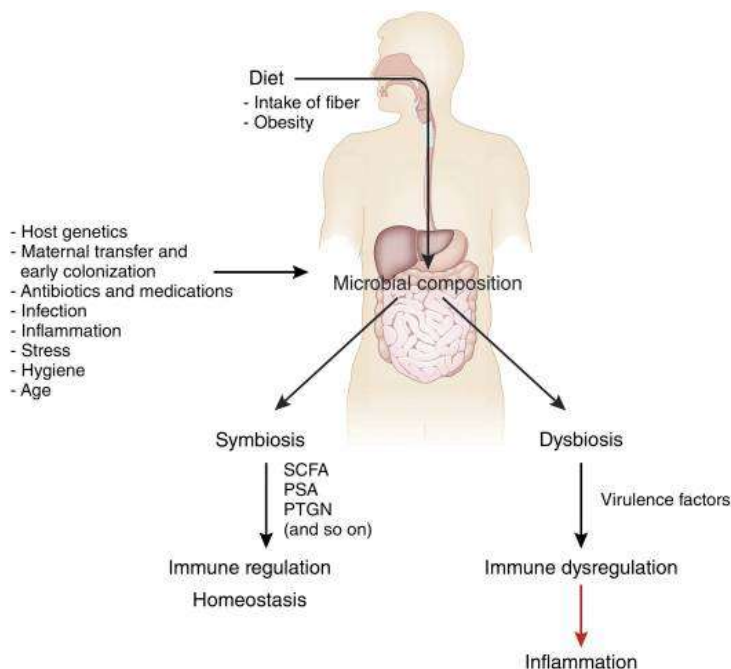


Figura 4. Influencia de diferentes factores en la simbiosis o disbiosis de la microbiota intestinal. Fuente: Johnson y Versalovic (2012).

#### 1.1.4.1. Modulación de la microbiota intestinal a través de macronutrientes

Diversos estudios muestran el cambio que existe en la microbiota intestinal y su diversidad, en función del consumo de la dieta. De esta manera, dependiendo del macronutriente mayoritario en un tipo de dieta, se asocia con el crecimiento de especies determinadas en la microbiota intestinal (Arumugan y col., 2011). Los hábitos dietéticos determinan lo que nuestras bacterias pueden consumir; es decir, la forma en que estamos "alimentando" a nuestra microbiota. Para confirmar esta hipótesis, algunos investigadores, estudiaron la microbiota oral, como los dientes y el esqueleto de personas que vivieron en diferentes épocas. Demostraron que los cambios más significativos, en la microbiota intestinal, ocurrieron en dos épocas distintas: el paso del cazador-recolector (era paleolítica) a la agricultura

neolítica (hace 10000 años), con una dieta rica en carbohidratos así como el comienzo del periodo industrializado, caracterizado por el consumo de harina procesada y de azúcar (Chan y col., 2013).

Otros autores encontraron cambios sustanciales en la microbiota intestinal al cambiar a una dieta rica en grasas, observando una disminución del filo de los Bacteroidetes y un aumento de Firmicutes y Proteobacteria, siendo dichos cambios independientes de la obesidad (Cani y Everard, 2016). Turnbaugh y col. (2009) presentaron un estudio en esta dirección, trasplantaron comunidades microbianas fecales de adultos humanos, frescas o congeladas en ratones C57BL / 6J libres de gérmenes. Curiosamente, estos ratones reprodujeron gran parte de la diversidad bacteriana de la microbiota del donante. Un cambio en la dieta (es decir, de un aporte de polisacáridos vegetales y dieta baja en grasa a una dieta alta en grasa y azúcar) cambió la estructura de la microbiota incluso en un solo día. Estos ratones mostraron una mayor adiposidad y este rasgo también fue transmisible a través de un trasplante de microbiota. Por lo tanto, ambos estudios demostraron que la dieta afecta de manera crítica a la MI y dichos cambios pueden ocurrir muy rápidamente (Turnbaugh y col., 2009).

Otro estudio demostró que un aumento en la ingesta calórica de 2400 a 3400 kcal / día (con un perfil de nutrientes similar que incluía 24% de proteína, 16% de grasa y 60% de carbohidratos) aumentó la representación de Firmicutes y disminuyó la representación del filo de los Bacteroidetes (Jumpertz y col., 2011). En otro trabajo realizado se observaron diferencias muy notables entre la MI de niños de Burkina Faso (África Occidental) en comparación de niños de Italia (De Filippo y col., 2010). En los niños de Burkina Faso, que llevaban una dieta baja en grasas y proteínas animales y rica en almidón, fibra y polisacáridos vegetales, se encontró una mayor cantidad de Actinobacteria (10,1% frente a 6,7%) y Bacteroidetes (57,7% frente a 22,4%). Por su parte, en la microbiota de niños de Italia se encontró una mayor proporción de Firmicutes (un 63,7% frente a 27,3%) y Proteobacteria principalmente (un 6,7% frente a un 0,8%), comiendo una dieta propia del mundo desarrollado (Qin y col., 2010; De Filippo y col., 2010).

La composición de la MI también está influenciada de un modo importante por la cantidad de fibra dietética consumida. Según la *American Association of Cereal Chemists*, se define fibra dietética como las partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos, que son resistentes a la digestión y la absorción en el intestino delgado humano, pero con fermentación parcial en el colon (AACC, 2001).

#### **1.1.4.2. Modulación de la microbiota intestinal a través de micronutrientes**

Aunque los patrones dietéticos tienen un efecto importante en la MI, los efectos individuales de los componentes minoritarios de los alimentos han sido menos investigados que las diferentes proporciones de macronutrientes en la dieta (Roca-Saavedra y col., 2017). Sin embargo, los micronutrientes son fundamentales para numerosas funciones relacionadas con la salud, como por ejemplo en el metabolismo energético, el crecimiento, la diferenciación celular, y las funciones específicas de numerosos órganos, así como del sistema inmune (Russell y col., 2015). Una dieta baja en micronutrientes, pero no necesariamente baja en energía, es frecuente en poblaciones de países de bajos ingresos, pero también puede estar presente en entornos afectados por la pobreza en países de ingresos medios y altos (Biesalski, 2016). Se estima que más de tres mil millones de personas en todo el mundo sufren diversos tipos de deficiencias de micronutrientes (predominantemente vitamina A, hierro y zinc), siendo la mayoría mujeres y niños (Biesalski, 2016).

De entre ellas, la deficiencia más frecuente a nivel mundial es la deficiencia de hierro (Biesalski, 2016). Aunque es difícil determinar de un modo aislado los efectos que dicha deficiencia pueda tener sobre la MI (la deficiencia de hierro está generalmente ligada a situaciones de malnutrición), si se ha comprobado que en mujeres que presentaban dicha deficiencia, y que no presentaban malnutrición, se encontró una menor cantidad de *Lactobacillus* en su MI (Mikkelsen y col., 2016). Por

su parte, también se ha comprobado que la vitamina A puede modular la respuesta inmune del intestino por las interacciones con las células inmunes y la modulación de la microbiota (Brown y Noelle, 2015). Otro mineral que es capaz de influir de modo relevante sobre la MI es el Zn. Dosis profilácticas de dicho oligoelemento en varios modelos animales demostraron que incrementaban la presencia de grupos bacterianos anaerobios facultativos Gram-negativos, la concentración de AGCC, así como la riqueza y diversidad de especies en general (Starke y col., 2014; Reed y col., 2015). Además, también se ha encontrado que miembros del filo de los Firmicutes, específicamente de *Lactobacillus*, incrementan su presencia en la MI, después de la administración de ZnO (Reed y col., 2015).

Otros constituyentes menores de la dieta, incluyendo varios compuestos que pertenecen al grupo de los polifenoles, también muestran efectos significativos sobre las bacterias del colon (Conlon y Bird, 2015). Los polifenoles son metabolitos secundarios que se encuentran en una amplia variedad de alimentos, como frutas, verduras, hierbas, semillas, cereales, y en bebidas, como el café, el té, el cacao y el vino (Etcheberry y col., 2016). Los polifenoles no se absorben a nivel intestinal, por lo que alcanzan el colon, donde son biotransformados y aumentan su biodisponibilidad. Además, son capaces de ejercer cierta modulación sobre la composición de la MI, principalmente inhibiendo bacterias patógenas y estimulando el crecimiento de bacterias beneficiosas (Etcheberry y col., 2013; Martínez y col., 2013; Ozdal y col., 2016). De entre los diferentes compuestos pertenecientes al grupo de los polifenoles, varios de ellos han sido reconocidos como agentes antimicrobianos potenciales con efectos bacteriostáticos o bactericidas y con efectos diferentes en función del género o especie bacteriana del que estemos hablando (Ozda y col., 2016). Específicamente, estudios demuestran que los flavonoles, la quercetina, la catequina, la puerarina, las antocianinas, los elagitaninos, el resveratrol y el trans-resveratrol, son capaces de modificar tanto la composición como las actividades de la MI (Etcheberry y col., 2015; Hsiao y col., 2013, Huang y col., 2016; Lee, 2013 Li y col., 2015; Qiao y col., 2014).



Por ejemplo, la suplementación con quercetina resultó en una alteración en la composición de la flora intestinal a diferentes niveles taxonómicos, incluyendo el FBR e inhibiendo el crecimiento de especies bacterianas asociadas con la obesidad inducida por la dieta, como *Erysipelotrichaceae*, *Bacillus spp.* y *Eubacterium cylindroides* (Etxeberria y col., 2015). En otros trabajos recientes, se demostró que diferentes tipos de flavonoides pueden modular el crecimiento de diferentes filos y géneros de la MI, incrementando la abundancia relativa de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y disminuyendo la de *Clostridium histolyticum*, que es un microorganismo potencialmente patógeno (Tzounis y col., 2011; Martin y col., 2012).

Qiao y col. (2014) encontraron que el consumo de resveratrol mejoró la disbiosis en la MI de ratones que estaban siguiendo una dieta rica en grasas, que en consecuencia les había favorecido un incremento en su proporción relativa de Firmicutes. Los efectos específicos del resveratrol incluyeron una mejora en el ratio Firmicutes/ Bacteroidetes, una inhibición significativa del crecimiento de *Enterococcus faecalis* y un aumento del crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los flavonoles también pueden aumentar la abundancia relativa de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* a expensas de bacterias potencialmente patógenas, especialmente *Clostridium histolyticum* (Martin y col., 2012).

Además de los ya mencionados polifenoles, otros componentes minoritarios de los alimentos también pueden modificar de un modo relevante la MI, si bien no han recibido tanta atención por parte de la comunidad científica en los últimos años. De este modo, se ha publicado que el ácido linoleico conjugado (CLA) incrementa los niveles de *A. muciniphila*, que se asocia con efectos beneficiosos en el metabolismo (Cani y Everard., 2016). También se encontró que la L-carnitina, presente en carnes rojas, puede ser metabolizada a trimetilamina y óxido de trimetilamina, y aumentar de este modo el riesgo de aterosclerosis (Koenig y col., 2011). Una vez metabolizada la L-carnitina, no es este su único riesgo para la salud humana, sino que también mediante la acción de bacterias presentes en la MI, tanto la



dimetilamina y trimetilamina, pueden ser transformadas en dimetilnitrosamina (Abdou y col., 2016), una hepatotoxina muy potente que además es carcinógena.

### **1.1.4.3. Efectos de los aditivos alimentarios sobre la microbiota intestinal**

Una de las modificaciones más características en las dietas habituales en los países desarrollados durante el siglo XX es el aumento en el consumo de aditivos alimentarios. Estos compuestos se incorporan hoy en día a casi todos los alimentos procesados, ya sea para mejorar características importantes a la hora de su comercialización, como son su estabilidad, vida útil, sabor o textura. La base principal para el uso de estos agentes es la noción de que no causan toxicidad aguda a concentraciones razonablemente mayores que sus concentraciones aprobadas (Swithers y col., 2010). No obstante, el efecto que dichos aditivos pueden llegar a causar en la microbiota y microbioma humano es en gran medida, aún desconocido. Esto es debido a que es muy difícil la asignación de cohortes de individuos sanos que no hayan sido previamente expuestos a aditivos alimentarios. Además, no sólo es difícil encontrar personas que no hayan sido expuestos a dichos compuestos a lo largo de su vida, sino que también es necesario disponer de una cantidad de personas importante que permita realizar una estratificación lo suficientemente robusta para que los estudios no sean sesgados por factores como la genética, el estilo de vida y los patrones dietéticos (Chassaing y Gewirtz, 2016). En consecuencia, los investigadores han recurrido a modelos animales para estudiar el efecto de los aditivos alimentarios en la flora intestinal.

Aun teniendo en cuenta dichas limitaciones, estudios recientes han demostrado que el consumo de edulcorantes no nutritivos (NNS) y agentes emulsionantes (EDs) puede alterar la MI, provocando inflamación intestinal y favoreciendo de este modo el desarrollo del síndrome metabólico (Chassaing y Gewirtz, 2016; Clemente y col.,

2015). Hoy en día, la mayoría de los alimentos procesados contienen uno o más agentes emulsionantes para permitir a estos alimentos mantener las texturas deseadas. Algunos autores han sugerido que éstos pueden ser un factor específico resultante de la industrialización que ha contribuido a reducir la diversidad bacteriana en la MI, y al aumento de la incidencia del síndrome metabólico y otras enfermedades inflamatorias (Foreyt y col., 2012; Swithers y col., 2010). De este modo, trabajos anteriores han demostrado que dos agentes emulsionantes, denominados carboximetilcelulosa y polisorbato 80, tuvieron un efecto significativo favoreciendo la proliferación bacteriana en el intestino delgado de ratones y facilitando la translocación de las bacterias a través del epitelio intestinal. Además de esto, se observó una reducción del espesor de la capa de moco y participaron en el inicio de la inflamación intestinal, la obesidad y la diabetes. Estos efectos también se asociaron con un aumento de la ingesta de alimentos, si bien dichos autores no pudieron determinar cuál es el mecanismo que lo origina (Swithers y col., 2010).

Otro grupo de aditivos alimentarios del cual se ha incrementado de manera notable su consumo en las últimas décadas, son los NNS. Dichos compuestos se han incrementado como consecuencia del conocimiento acerca de los efectos de un consumo excesivo de azúcar para la salud humana (Chassaing y Gewirtz, 2016). Los NNS son compuestos sintéticos varios cientos de veces más dulces que la sacarosa. Por tanto, pueden utilizarse en pequeñas cantidades con un valor calórico añadido despreciable. Los NNS se excretan inalterados del cuerpo de los mamíferos y, por lo tanto, se consideran metabólicamente "inertes" (Shankar y col., 2013).

Teóricamente, el consumo de NNS sólo ayudaría en la pérdida de peso, ya que el descenso que se produce en la ingesta calórica al suprimir el azúcar no se compensa mediante el incremento en el consumo de otro nutriente. No obstante, diversos autores han publicado que se produce un incremento en la ingesta de otros nutrientes como compensación de la reducción del consumo de azúcares tras su sustitución por los NNS (Abdou-Donia et al., 2008; Saad y col., 2012).

Quizás sea este último mecanismo el que explica por qué el consumo habitual de este tipo de edulcorante se ha relacionado con un incremento en el IMC de niños y adolescentes (Murphy y col., 2014; Saad y col., 2012). Dichos efectos también podrían estar relacionados no sólo con el incremento compensatorio de la ingesta de otros nutrientes tras reducirse la ingesta de azúcar, sino que también podrían influir de un modo importante la acción de los NNS en la MI. Los NNS, como la sacarina, la sucralosa, el aspartamo y la stevia presentan efectos bacteriostáticos (Chassaing y Gewirtz, 2016; Pepino, 2015; Yap y col., 2013), y dicho efecto bacteriostático no se limitan a la flora bacteriana de la boca, sino que se extienden a la del intestino (Borukas y col., 2015; Chassaing y Gewirtz, 2016; Li y col., 2016; Pepino, 2015).

También se han investigado los efectos de otros aditivos en la MI humana. Por ejemplo, los aceites esenciales (AE), que son también compuestos que pueden tener efectos específicos en la MI humana. Estos compuestos se emplean para prevenir el crecimiento de especies bacterianas patógenas que son generalmente más sensibles a los aceites esenciales que la mayoría de las bacterias comensales (Thapa y col., 2015). De entre los AE, se ha demostrado que el thymol, que además de emplearse como aditivo alimentario también se suele usar como tratamiento complementario a la quimioterapia en el caso de cánceres en el tracto gastrointestinal. En este sentido, los pacientes que reciben quimioterapia para tratamientos contra el cáncer sufren trastornos gastrointestinales debido a daños en las células mucosas de la MI y alteran el equilibrio ecológico intestinal. En consecuencia, la quimioterapia aumenta el riesgo de infecciones bacterianas, como el crecimiento excesivo de *C. difficile* (Thapa y col., 2015) y mientras que disminuye algunas poblaciones microbianas beneficiosas tales como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Veillonella* y *F. prausnitzii*. En consecuencia, los AE pueden ser explotados como agentes profilácticos y como complementos en la quimioterapia para proteger bacterias comensales, incluyendo *Bifidobacterium* spp. y *F. prausnitzii* (Roberts y col., 2010).

Finalmente, aunque han recibido menos atención por parte de la comunidad científica que en los casos anteriores, también se han publicado efectos sobre la MI otros compuestos que, de modo intencionado o accidental, pueden estar incluidos en los alimentos que consumen las personas. De entre éstos, cabe destacar los residuos de fármacos de uso veterinario, que tras su administración a los animales productores de alimentos, pueden permanecer a bajas concentraciones en los alimentos producidos por los mismos. Los que se encuentran de manera más habitual en los alimentos de origen animal son los antibióticos (Baynes y col., 2016), de los cuales un reciente estudio demostró que los más habitualmente encontrados en alimentos de origen animal en Europa son por este orden las tetraciclinas, las penicilinas y las sulfamidas (Grave y col., 2014).

#### **1.1.4.4. Efectos de los antibióticos sobre la microbiota intestinal**

Si bien existen multitud de fármacos que pueden tener efectos directos sobre la MI, como son los antidiabéticos (Forslund y col., 2015), con mucha diferencia, aquellos que tienen una acción más directa y causan una mayor variación sobre la MI son, sin lugar a duda, los antibióticos (Clemente y col., 2015; Russell y col., 2015; Saad y col., 2012). Los antibióticos, en países desarrollados, son uno de los fármacos más prescritos en medicina humana, particularmente en la edad infantil (Gibson y col., 2015; Laniro y col., 2016). Es precisamente en este colectivo, en los niños, en los cuales los antibióticos ejercen un efecto más drástico sobre la MI (Gibson y col., 2015).

Estudios epidemiológicos han confirmado la relación positiva, especialmente en las primeras edades, entre el uso de antibióticos y el aumento de peso en humanos, e indicaron que incluso la exposición prenatal a antibióticos predispone al sobrepeso infantil (Cox y Blaser, 2015; Korpela y de Vos, 2016). Este efecto es aún mayor cuando la exposición ocurre tras el nacimiento durante los 6 primeros meses de

vida (Ajslev y col., 2011; Murphy y col., 2013; Trasandre y col., 2013). Además, también se ha demostrado que la predisposición a la obesidad derivada de la exposición a los antibióticos, son diferentes dependiendo del espectro del antibiótico (Bailey y col., 2014; Mikkelsen y col., 2016), edad del sujeto (Cox y Blaser, 2015, Korpela y de Vos, 2016) e incluso en función del sexo del paciente (Ajslev y col., 2011, Azad y col., 2014, Mikkelsen y col., 2016).

Del mismo modo, el tratamiento de recién nacidos prematuros y de bajo peso al nacer con una variedad de antibióticos, incluyendo penicilina, ampicilina, cefalexina, gentamicina, ampicilina, eritromicina, vancomicina, clindamicina y lincomicina, se ha relacionado con un aumento de Enterobacteriaceae, junto con una disminución de géneros bacterianos relacionados con una microbiota saludable, como *Bifidobacterium*, *Bacillus*, y *Lactobacillus* (Cho y col., 2012; Dethlefsen y Relman, 2011, Greenwood y col., 2014).

Los tratamientos con antibióticos también pueden alterar significativamente la composición de la microbiota del adulto, causando una disminución en la diversidad microbiana entre un cuarto a un tercio del estado pre-antibiótico (Gibson y col., 2015). Sin embargo, en esta etapa de la vida, la MI es relativamente fuerte y, en la mayoría de los casos, es capaz de recuperar su estado inicial después de varias semanas de cesar el tratamiento antibiótico (Palmnäs y col., 2014). Sin embargo, otros estudios han demostrado que después de cesar el tratamiento, la microbiota requiere varios meses para recuperarse completamente (Jakobson y col., 2010; Laniro y col., 2016; Manichahn y col., 2010; Panda y col., 2014), e incluso algunos grupos bacterianos no reaparecen aún tras varios años después de la interrupción del tratamiento (Clemente y col., 2012; Cresci y Bawden, 2016; Vrieze y col., 2014). Estos efectos pueden ser incluso más graves en personas de edad avanzada, en cuya MI es menos diversa en comparación con los adultos más jóvenes y un equilibrio más inestable que fácilmente puede conducir a la aparición de diversas patologías (Claesson y col., 2011, Power y col., 2014).

Paradójicamente, aunque los efectos de las dosis terapéuticas de los antibióticos empleados en medicina humana han sido ampliamente investigados en los últimos años, los efectos sobre la MI de los residuos de antibióticos presentes en alimentos a concentraciones permitidas, derivados de la medicina veterinaria, ha recibido poca atención. Sólo unos pocos trabajos se han centrado en los efectos de las bajas concentraciones de antibióticos en la MI (Cox y col., 2014; Dethlefsen y Relman, 2011; Van Vleck Pereira y col., 2016). Este hecho es sorprendente, ya que los antibióticos son los fármacos más empleados a nivel mundial en la industria ganadera (Baynes y col., 2016) y sus residuos, a dosis subterapéuticas, pueden llegar a los seres humanos a través de alimentos de origen animal (Cho y col., 2012).

Basándose en este postulado, Ternak (2005) fue el primero en proponer que la exposición humana a los antibióticos a dosis bajas, puede estar contribuyendo al aumento de peso en humanos (Ternak, 2005). Desde la década de 1940, los agricultores han añadido dosis bajas de antibióticos a los alimentos o agua del ganado para la promoción del crecimiento de los animales de granja (Cho y col., 2012). Como consecuencia, en los países en los que se permite el uso de antibióticos como promotores del crecimiento como USA, las ventas y distribución de agentes antimicrobianos aprobados para su uso en animales productores de alimentos eran aproximadamente cuatro veces el total vendido y distribuido para el tratamiento de infecciones humanas (FDA, 2011). Incluso en la Unión Europea, en la que los antibióticos fueron prohibidos para actuar como promotores del crecimiento (Reglamento CE 1831/2003), el uso de antibióticos en medicina veterinaria es habitual y, como consecuencia, los residuos de antibióticos pueden llegar a bajas concentraciones a los seres humanos a través de alimentos o a través del agua potable (Andersson y col., 2014, Cox y Blaser, 2015). Dado que los antibióticos son ampliamente utilizados para fomentar el crecimiento del ganado, es posible que las carnes y la leche de estos animales estén contaminadas con residuos traza de estos agentes (Riley, 2013).

Los antibióticos ejercen acciones muy diferentes sobre los grupos individuales que constituyen la MI. En general, durante un período variable después de finalizar el tratamiento antibiótico, la microbiota tiende a recuperar su composición original. Sin embargo, en algunos individuos, se ha podido comprobar que algunas especies bacterianas que desaparecen como consecuencia del tratamiento antibiótico lo hacen de manera irreversible (Dethlefsen y Relman, 2011). Esto puede influir en la salud del huésped, sobre todo si el grupo bacteriano que se suprime afecta de modo directo a una función fisiológica relacionada con la salud humana (Clemente y col., 2012). Como efectos adicionales, Cho y col. (2012) encontraron un aumento significativo en la relación Firmicutes/ Bacteroidetes como resultado de la administración de betalactámicos y vancomicina. Otros autores (Dethlefsen y Relman, 2011) encontraron disminuciones significativas en los taxones asociados con propiedades beneficiosas para la salud, como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. y aumentos significativos de géneros incluidos en la familia Enterobacteriaceae, que incluye muchos géneros considerados potencialmente patógenos. Otros autores (Russell y col., 2015) trataron ratones con antibióticos como amoxicilina, metronidazol, cefoperazona, y una combinación de los tres. Como resultado, las Proteobacterias y, en particular, las Enterobacteriaceae, se vuelven dominantes en el tracto intestinal de los ratones tratados, representando el 73% de la microbiota total. Dos semanas después de cesar el tratamiento del antibiótico, la microbiota de estos animales recuperó una proporción relativamente baja de Proteobacteria (5,77%), aunque permaneció considerablemente más abundante que el porcentaje de la microbiota total que representa este filo en ratones no tratados (1,2%). Aunque las proteobacterias representan generalmente alrededor del 15% de la microbiota intestinal (Hu y col., 2013), acumulan más del 35% de los genes de resistencia a los antibióticos contenidos en el microbioma. En contraste, a pesar de representar el 31% de la microbiota total, los Bacteroidetes sólo acumulan el 6% de los genes de resistencia a los antibióticos (Russell y col., 2015; Hu y col., 2013). Por lo tanto, es factible que un tratamiento antibiótico puede causar menos declive en la población de Proteobacteria (o incluso aumentar, ocupando el espacio dejado por otros grupos bacterianos más



sensibles a la acción del antimicrobiano) que Bacteroidetes, por ejemplo. Del mismo modo, también es razonable pensar que una vez que la Proteobacteria alcance una alta proporción dentro de la microbiota, dichos niveles continúen siendo elevados tras el cese de la acción del antibiótico, al menos durante un tiempo (Russell y col., 2015).

También es un hecho importante el que muchos de los estudios que se han llevado a cabo hasta el momento acerca de los efectos de los antibióticos sobre la MI, se han llevado a cabo exclusivamente en animales de experimentación. Sin menospreciar la validez que estos estudios tienen, si es cierto que los seres humanos tienen una mayor variación en la dieta y el estilo de vida que los ratones habitualmente empleados en experimentación, por lo que los resultados obtenidos exclusivamente en ratones no son totalmente extrapolables a humanos (Dethlefsen y Relman, 2011).

## **1.2. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA VETERINARIA**

Los antibióticos son sustancias químicas específicas producidas por organismos vivos o fabricados mediante síntesis, capaces de interferir en el desarrollo de ciertos microorganismos (acción bacteriostática) o de provocar su destrucción (acción bactericida) (Rao y col., 2011). La producción total de antibióticos a nivel mundial puede estimarse entre 100.000- 200.000 antibióticos y la población humana está siendo influenciada, directa o indirectamente (por el medio ambiente) por esta cantidad de fármacos (Gabor, 2004). Desde ya hace décadas, el uso excesivo de estas sustancias he llevado a las autoridades sanitarias a nivel mundial a alertar acerca de las consecuencias que dicho uso está originando, especialmente en lo relativo a la extensión de las resistencias bacterianas a dichos antibióticos (Baynes y col., 2016). Quizás la regulación más exigente en lo referente al empleo de

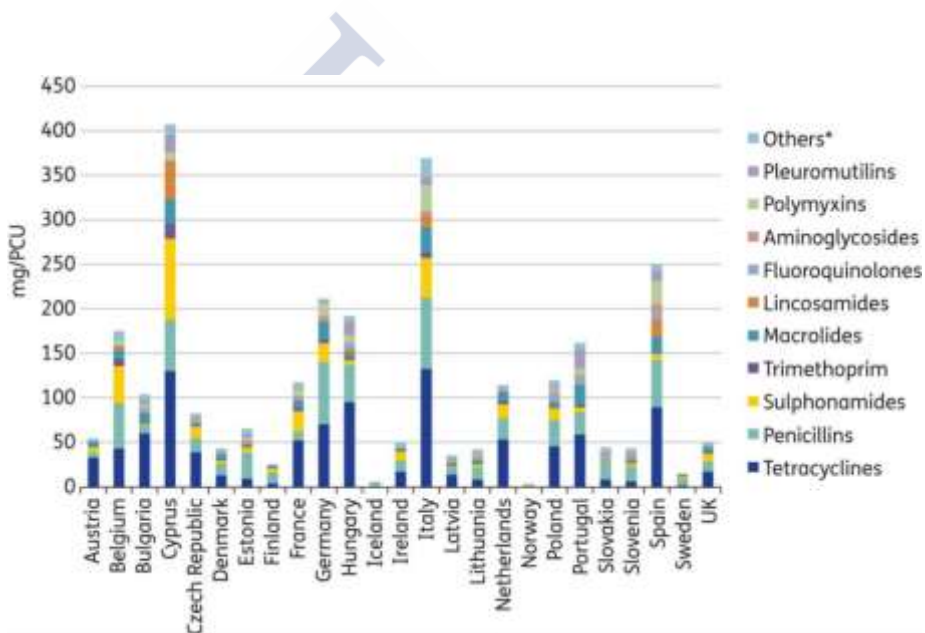


antibióticos en animales productores de alimentos en la legislación Europea, surgió en el año 2006 que prohibió totalmente el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento (Reglamento 1831/2003).

En nuestro país, ya en el año 1990 la ley 25/1990 del medicamento (posteriormente derogada por la Ley 29/2006, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios), desarrollada en lo referente a la comercialización, prescripción y dispensación de los medicamentos veterinarios mediante el RD 109/1995, estableció como obligatoria la receta veterinaria para un amplio abanico de fármacos, entre ellos, los antibióticos. Este hecho, unido a la obligatoriedad de conservar estas recetas por parte del centro dispensador del medicamento, así como por parte del facultativo veterinario y del propietario de los animales, ha representado conjuntamente con la creación de los libros de tratamientos de explotación, una importante medida de regulación en el uso de estos fármacos. Posteriormente, el Reglamento (CE) 1831/2003, prohibió totalmente a partir del 1 de Enero de 2006 el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento, contribuyendo a reducir el consumo total de los mismos en medicina veterinaria. A partir de dicho momento, los antibióticos quedaron únicamente autorizados para la administración a un animal o grupo de animales que presente síntomas de infección clínica (terapia), o bien para la administración de un antimicrobiano a un animal o grupo de animales en los cuales la morbilidad y/o mortalidad ha excedido la frecuencia habitual (control).

Aun así, el empleo de antibióticos en medicina veterinaria a nivel europeo, si bien es más bajo que en otros lugares del mundo, sigue siendo muy importante. A este respecto, recientemente las Agencias de Medicamentos y la Federación de Veterinarios de Europa hicieron una encuesta para el conocimiento de la prescripción europea de antibióticos, en particular para destacar las enfermedades para las que se dice que los antibióticos se prescriben con mayor frecuencia y sus diferentes clases, incluyendo los antibióticos de importancia crítica humana (Grave y col., 2014). Dicha encuesta se llevó a cabo entre 3004

profesionales de 25 países, entre ellos España. Esto dio como resultado que en el total de ganado bovino (vacuno y terneros) que se dio respuesta, un total de 4166 casos, las clases de antibióticos más frecuentemente mencionados fueron las penicilinas. En la población total de cerdos, con un total de 512 casos, los antibióticos más frecuentemente empleados en este caso, en primer lugar, fueron tetraciclinas y en segundo lugar fueron las penicilinas (De Briyne y col., 2014). A partir de dichos datos, Grave y col., (2014), describieron cuáles son los grupos de antibióticos más empleados en medicina veterinaria de 25 países europeos durante el año 2011 (**Figura 5**).



**Figura 5:** Ventas de agentes antimicrobianos veterinarios en 25 países de la UE y Área Económica Europea en el año 2011. Fuente: Grave y col., 2014.

En todos los países, las tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas representaron más de la mitad (rango 53% -88%) de la cantidad total de agentes antibióticos vendidos por país, expresada en mg / PCU (Grave y col., 2014) (**Figura 6**).

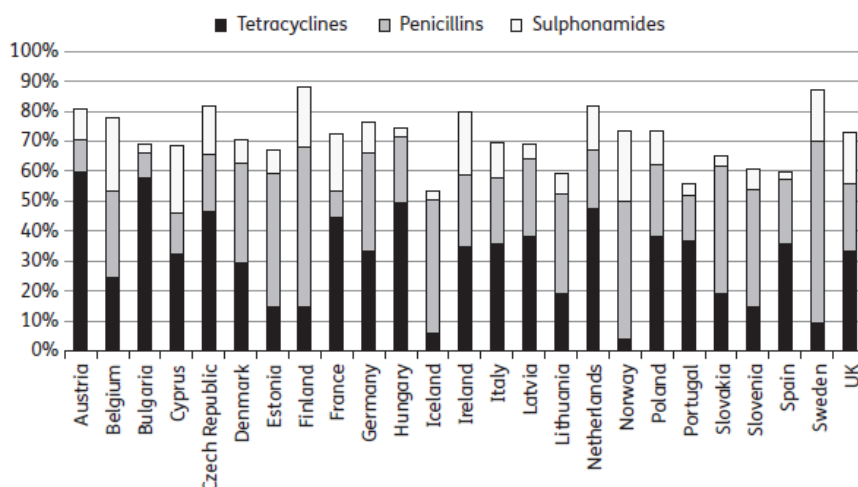


Figura 6. Ventas de tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas como porcentaje de las ventas totales de antibióticos veterinarios para la producción de alimentos. Fuente: Grave y col., 2014.

### 1.2.1. Tetraciclinas

Las tetraciclinas tuvieron su origen a finales de la década de los cuarenta, como resultado de la necesidad de nuevos antibióticos. Esta familia de antibióticos se desarrolló a partir de microorganismos (*Streptomyces aureofaciens*) presentes en muestras de suelos recogidos en diferentes partes del mundo (Franfe y Neu, 1987). El primer compuesto perteneciente a esta familia, la clortetraciclina, fue descubierta en 1948 por el Dr. Benjamin Duggar, que en dicha época trabajaba en los Laboratorios Lederle (American Cyanamid) (Duggar, 1948). Poco después, a principios de los años cincuenta Alexander Finlay de Pfizer descubrió la oxitetraciclina (Finlay y col., 1950), y a partir de este momento, se van desarrollando nuevos antibióticos pertenecientes a esta familia, en el orden siguiente: tetraciclina, 1952; democlociclina, 1957; metaciclina, 1961; doxiciclina, 1966; minociclina, 1972 y limeciclina, 1976. Esta familia de antibióticos fue denominada de manera conjunta como “tetracilinas” por tener una estructura química común (Goodman y col., 1990; Stephens y col.,

1952). Todas las moléculas pertenecientes a esta familia tienen la misma estructura básica, 4 anillos unidos en línea, y a partir de ellos, la unión de diferentes grupos funcionales en distintos carbonos origina los diferentes compuestos. Otra característica importante derivada de la estructura de las tetraciclinas es su fuerte actividad como agentes quelantes de iones metálicos, lo que determina en gran parte su actividad antimicrobiana y sus propiedades farmacocinéticas.

Las tetraciclinas son antibióticos que poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo efectivas tanto contra bacterias gram-negativas, (aerobias y anaerobias), como contra gram-positivas, además de algunos microorganismos atípicos como clamydias, micoplasmas, rickettsias y algunos protozoos (Griffin y col., 2010). También en ocasiones son empleadas como agentes profilácticos en medicina humana en la prevención de la malaria causada por *Plasmodium falciparum*, especialmente en aquellos casos en que dicho protozoo resiste la acción de la mefloquina. Actualmente el aumento en las resistencias bacterianas a las tetraciclinas producido en los últimos años como consecuencia de la utilización masiva de las mismas como promotores del crecimiento, actividad prohibida actualmente en la UE pero de uso corriente en países como USA, ha limitado de un modo importante su uso terapéutico (Nguyen y col., 2014). Esta actividad, actualmente se encuentra prohibida dentro de la UE, pero sigue siendo legal en la inmensa mayoría del mundo, incluyendo países tan representativos como E.E.U.U.

El mecanismo de acción es un efecto bacteriostático basado en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas. Dicha inhibición la llevan a cabo evitando la asociación entre el aminoacil-ARNt y el ribosoma, uniéndose las tetraciclinas específicamente a la subunidad 30S del ribosoma. El resultado es que se impide la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en formación, lo que impide la enlongación de la cadena. Algunas tetraciclinas inhiben también la síntesis de proteínas en células eucariotas, lo cual es de utilidad para combatir algunos protozoos (Nguyen y col., 2014). Se ha sugerido que el mecanismo de actuación en este caso estaría relacionado con la

presencia de ribosomas de tipo bacteriano en las mitocondrias, aunque actualmente no existe una explicación molecular satisfactoria para este efecto (Shales, 2006).

### 1.2.2. $\beta$ -lactámicos

Los  $\beta$ -lactámicos son una familia de antibióticos cuya característica común más relevante es la presencia dentro de su estructura de un anillo betalactámico, que les da nombre. Dentro de esta familia, existen diferentes grupos, como son las penicilinas, las cefalosporinas, las carbapenemas, las monobactamas, así como los inhibidores de las betalactamasas, que suelen combinarse en las preparaciones farmacéuticas con alguno de los anteriores para prevenir el desarrollo de resistencias bacterianas (Martin y Gudíol, 2003).

El mecanismo de acción de los  $\beta$ -lactámicos es bactericida, mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, induciendo además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano. En las bacterias gram-positivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína. Las bacterias gram-negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano (Martin y Gudíol, 2003).

Los  $\beta$ -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano, y por consiguiente, la pared celular bacteriana. Esta acción se produce a concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas, pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes a la acción del antibiótico.

El espectro de los  $\beta$ -lactámicos incluye bacterias gram-positivas, gram-negativas y espiroquetas. No son activos sobre los micoplasmas porque éstos carecen de pared celular, ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural de las micobacterias se debe a la producción de  $\beta$ -lactamasas probablemente unido a una lenta penetración por las características de la pared (Martin y Guidol, 2003). Quizás por este amplio espectro, este grupo sea uno de los más empleados en el mundo, tanto en medicina humana como en veterinaria. El más empleado de todos ellos es la ampicilina, tanto en medicina humana (Gibson y col., 2015), como en veterinaria (Economou y Gousia, 2015). Este antibiótico es capaz de penetrar en bacterias gram-positivas y algunas gram-negativas, donde es capaz de inhibir la tercera y última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, que finalmente conduce a la lisis celular (Demonty, 1996; Penicillins systemic, 1994). Su elevado uso se debe a una combinación entre su bajo precio, su excelente tolerancia y su capacidad de alcanzar altas concentraciones en tejidos blandos periféricos (Martin y Guidol, 2003).

### 1.2.3. Sulfamidas

Las sulfamidas son fármacos antimicrobianos de amplio espectro, que se utilizan tanto por sí mismos como en combinación con otros fármacos en el tratamiento de infecciones por organismos aerobios, tanto gram-positivos como gram-negativos en casi todas las especies domésticas. Son el primer ejemplo de sustancia química con acción bactericida sintetizada por el hombre.

La primera sulfamida fue descubierta por Paul Gelmo en 1908 de forma accidental cuando intentaba conseguir mejores colorantes para teñir la lana. Tras él, en 1935 un patólogo alemán llamado Gerhard Domagk publicó el primer informe sobre la actividad antimicrobiana de dicho tinte, que ya había sido patentado en 1932 bajo el nombre de Prontosil (Domagk y col., 1935). Domagk demostró que dicho tinte,

además de su acción como tal, también era capaz de eliminar bacterias del género *Streptococcus* de ratones infectados. La posterior investigación concluyó que dicho producto se metabolizaba en el organismo produciendo posteriormente sulfanilamida y que este metabolito era el responsable de la acción antibacteriana (Sköld, 2000).

Son antimicrobianos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro, inicialmente con actividad frente a una gran variedad de microorganismos gram-positivos y gram-negativos pero con posterior desarrollo de una amplia tasa de resistencia hacia dichos antibióticos. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos bacterianos, gracias a su enorme similitud con el p-aminobenzoico, precursor del ácido fólico y de los ácidos nucleicos en las bacterias. Dentro de las sulfamidas, existen numerosos compuestos con diferentes propiedades farmacocinéticas y también muy diferentes efectos secundarios. Sin embargo, todos comparten el mismo modo de acción y por ello, es frecuente que exista resistencia cruzada entre ellos (Sköld., 2000; Greenwood, 2003). Quizás por ello, por ser consideradas ya poco efectivas en el tratamiento de infecciones en seres humanos, su uso en medicina veterinaria es hoy en día mucho mayor que en el caso de la medicina humana, siendo hoy en día muy empleadas en el ganado bovino, porcino y avícola (Grave y col., 2014).

De entre todas ellas, la más empleada hoy en día es la sulfadiazina (4-amino-N-2-pirimidinilbencenosulfonamida), generalmente empleada en forma libre como una sal sódica. Esta sulfamida tiene numerosas aplicaciones como agente antibacteriano sistémico. Por ejemplo, en oftalmología se utiliza en el tratamiento del tracoma y la toxoplasmosis ocular. También se utiliza en el caso de pacientes sensibles a la penicilina y, junto con el sulfametoxazol, es la sulfamida más empleada tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (Braga y col., 2010).



#### 1.2.4. Concentraciones de antibióticos según los límites máximos de residuos

Tras finalizar el empleo de un agente antimicrobiano en un animal del cual se obtienen alimentos destinados al consumo humano, es necesario esperar un determinado período de tiempo antes de su sacrificio, que varía dependiendo tanto del antibiótico empleado como de la especie animal en la que se emplee y tipo de alimento que se obtenga a partir de dicho animal. Este es el denominado “período de supresión”, necesario para poder obtener alimentos con concentraciones de residuos, procedentes del uso de medicamentos, inferiores a los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en la legislación Europea. Este tiempo de espera se establece mediante estudios de depleción fijados para cada formulación comercial, a partir de las vías de administración recomendadas y para todas las especies de destino. Se determina así el período tras el cual las concentraciones detectadas son inferiores al LMR y se le añade un período de seguridad para compensar la variabilidad biológica, cuyos valores van desde un 10% a un 30% del obtenido en los estudios de depleción.

Según el Reglamento 37/2010, los LMR para las tres familias de antibióticos que hemos mencionado se pueden observar en la **Tabla 2**. No obstante, a pesar de todas estas precauciones legales, tras la administración de un antibiótico a un animal de abasto, permanecen residuos de dichos antibióticos en los alimentos producidos por éstos que alcanzan a los seres humanos a través de su consumo. A este respecto, algunos autores han señalado la posibilidad de que la ingesta periódica de dichos residuos sea uno de los factores predisponentes al incremento de la obesidad en los países desarrollados, que habitualmente emplean sistemas de producción animal intensivos en los que habitualmente es necesario el empleo de más antibióticos (Nobel y col., 2015; Riley y col., 2013; Ternak, 2005). Evidentemente, dicho riesgo es mucho mayor si estos medicamentos han sido administrados incorrectamente o si no se ha observado el período supresión reglamentario. De hecho, la vigilancia de dichos residuos en productos destinados al consumo de animales sacrificados se ha convertido en uno



de los deberes más importantes de las diferentes agencias de salud pública de los países que forman parte de la UE (Calza y col., 2004; Franek y col., 1999).



**Tabla 2. Sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere al Límite Máximo de Residuos (LMR) según el Reglamento 37/2010**

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana	Otras disposiciones (con arreglo al artículo 14.7 del Reglamento (CE) n° 470/2009)	Clasificación terapéutica
Ampicilina	Ampicilina	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg 50 µg/kg 4 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón Leche	Para los peces, el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». Los LMR en la grasa, el hígado y el riñón no se aplican a los peces. Para el porcino y las aves de corral, el LMR en la grasa se refiere a «piel y grasa en proporciones naturales». No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano.	Antiinfecciosos/ Antibióticos)
Sulfonamidas (todas las sustancias que pertenecen al grupo de las sulfonamidas)	Medicamento base	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg	Músculo	Los residuos combinados totales de todas las sustancias del grupo de las sulfonamidas no deben sobrepasar los 100 µg/kg. Para los peces, el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». Los LMR en la grasa, el hígado y el riñón no se aplican a los peces. No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano.	Antiinfecciosos/ Quimioterapéuticos
			100 µg/kg	Grasa		
			100 µg/kg	Hígado		
			100 µg/kg	Riñón		
			100 µg/kg	Leche		

		Bovinos, ovinos y caprinos				
Tetraciclina	Suma de medicamen to base y su 4-epímero	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg  300 µg/kg  600 µg/kg  100 µg/kg  200 µg/kg	Músculo  Hígado  Riñón  Leche  Huevos	Para los peces, el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». Los LMR en el hígado y el riñón no se aplican a los peces.	Antiinfecciosos/ Antibióticos



### 1.2.5. Concentraciones de antibióticos que pueden estar presentes en la alimentación de un adulto según las recomendaciones nutricionales

El Reglamento 2377/90/CEE define el **LMR** como: “el contenido máximo de concentración de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la UE o reconocida como admisible en un producto alimenticio”

Los **LMRs** se basan sobre el tipo y la cantidad de residuos que se consideran sin riesgo toxicológico para la salud humana y tiene en consideración el concepto de Ingesta Diaria Admisible (ADI), como también tiene en cuenta otros riesgos relevantes para la salud pública, así como los aspectos tecnológicos y la ingesta estimada de alimentos (JEFCA, 2000).

La **ADI** de un fármaco veterinario, hace referencia a la cantidad de dicho fármaco que, ingerido a lo largo de la vida, no representa ningún riesgo para la salud. En el caso de que el fármaco posea propiedades antimicrobianas, la ingesta representará la cantidad del mismo, que muestre no tener ningún efecto adverso sobre la MI. Estos valores se obtienen a través de los resultados provenientes de estudios *in vitro* o *in vivo* con animales de experimentación, después de administrarles el medicamento en el alimento durante períodos prolongados de tiempo (Cerniglia y Kotarski, 1999). Posteriormente, los resultados obtenidos son extrapolados al ser humano empleando unos coeficientes que dependen de la especie de animal de experimentación empleada. De esta manera se determina el nivel sin efecto observado (NOEL) y la ADI. Según la FAO (2004), se define la ADI como la máxima cantidad del medicamento que la especie experimental puede recibir sin ningún tipo de manifestación toxicológica. En general, lo que se hace es aplicar a la ingesta diaria aceptable del animal de experimentación que no se observa ningún efecto o NOEL, un factor de seguridad que se ubica normalmente en un valor de 100, aunque a veces puede ser más bajo. En casos debidamente justificados debido a existir un riesgo especial

para la salud humana, dicho factor de seguridad puede ser elevado a 1000. De esta manera, se obtiene la ADI para el consumidor (se refiere normalmente a una persona estándar de 60 kg), formando de este modo un concepto diferente al del LMR, si bien éste último nunca debe superar la ADI para el medicamento en cuestión.

A pesar de que la ADI incluye un factor de seguridad para extrapolar los datos de estudios *in vitro* e *in vivo* con animales a seres humanos, los últimos avances metodológicos relacionados con el estudio de la microbiología en seres humanos, sugiere que tal vez sea necesaria una revisión de los niveles mínimos que un agente antimicrobiano veterinario puede interrumpir o desequilibrar el ser humano y su microbiota intestinal (Korpela y de Vos, 2016; Laniro y Gasbarrini, 2016). Además, debe señalarse que no sólo existen exposiciones puntuales sino una exposición a largo plazo, ya que cada día la población humana está expuesta a niveles traza de estos compuestos (Laniro y Gasbarrini, 2016).

Otro parámetro de especial importancia, tratándose del tema que nos ocupa, es el nivel de dosis sin efecto microbiológico (NMEL), que puede definirse como la dosis que no produce efecto contra las especies bacterianas más sensibles, poniendo énfasis en las especies saprófitas del tracto gastrointestinal humano.

Teniendo en cuenta los parámetros anteriormente mencionados, hemos realizado un cálculo de la ingesta diaria de cada uno de los antibióticos a estudio, que se prevé que una persona ingiera acorde a una dieta en base a las actuales recomendaciones y consumos promedios según los estándares de la Dieta Atlántica, la cual geográficamente se corresponde con nuestra Comunidad Autónoma. En la tabla siguiente (**Tabla 3**) se resumen de forma global las raciones de cada grupo de alimentos, según las recomendaciones de la Dieta Atlántica (DA).

Tabla 3. Raciones tomadas de la Pirámide de la Dieta Atlántica.

Grupo de alimentos	Recomendaciones Dieta Atlántica
Cereales (se incluye arroz, pasta, galletas, pan...) y patatas	6-8 raciones/día
Frutas	≥ 3 raciones día.
Verduras y hortalizas	≥ 2 raciones/día.
<b>Lácteos</b>	<b>3-4 raciones/día.</b>
Legumbres	2-3 raciones/semana.
<b>Huevos</b>	<b>3-4 raciones /semana.</b>
<b>Carnes (principalmente magras)</b>	<b>3-4 raciones/semana.</b>
<b>Pescados</b>	<b>3-4 raciones/semana.</b>
Frutos secos	3-6 raciones semana.
<b>Agua</b>	<b>6-8 raciones/día.</b>
Aceite de oliva	3-4 raciones/día.
<b>Carnes grasas, embutidos, margarina, mantequillas</b>	<b>Alguna vez/mes.</b>
Bollería, snacks y golosinas	Alguna vez/mes.
Bebidas refrescantes o azucaradas	Alguna vez/mes.

Fuente: Tojo y Leis, 2007.

Según podemos observar en la tabla anterior, existen varios tipos de alimentos que son susceptibles de llevar residuos de antibióticos en concentraciones relevantes que son consumidos de manera habitual dentro del marco de nuestra dieta. Hemos de tener en cuenta para realizar un correcto cálculo, el peso de cada uno de los alimentos mencionados, ya que es diferente, por lo que en las **Tablas 4 y 5**, se muestran la cantidad que en el marco de la DA (Tojo y Leis, 2007) se recomienda de cada uno de los mencionados grupos de alimentos.

**Tabla 4. Pesos de raciones y medidas caseras de los alimentos según las recomendaciones de la Dieta Atlántica, que tienen poca probabilidad de contener residuos de antibióticos.**

<b>Grupos de alimentos</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Cereales</b>	
Arroz y pasta	60g de pasta
Pan y pan integral	30-40g de pan
Patatas	150-200g de patatas
Pasta para sopa	20g
Cereales de desayuno	25-30g
Galletas tipo María	6g
<b>Verduras y Hortalizas</b>	
Grellos, acelgas, espinacas, calabacín, champiñón, col de Bruselas, berenjena, espárrago, guisantes, zanahorias, pimiento rojo y verde, Lechuga, endivia, cebolla, Tomate	150-200g 50-100g 140g
<b>Frutas</b>	
Albaricoque, kiwi, manzana, melocotón, naranja, nectarina, pera, plátano	100-200g 110-150g
Melón, piña y sandía	100-150g
Cerezas, fresas y uvas	
<b>Frutos secos</b>	
Almendras, avellanas, cacahuete, nueces, pistachos	20-30g 60g
Castaña	50g
Higo seco, ciruela seca y dátil	
<b>Legumbres</b>	
Garbanzos, lentejas, habas	60-80g
<b>Grasas</b>	
Aceite de oliva	10ml
Mantequilla	10-15g

**Fuente:** Grupos de alimentos y pesos tomadas de Obxectivos de saúde nutricional nos comedores universitarios na USC: Dieta Atlántica (Tojo y Leis, 2007).

**Tabla 5. Pesos de raciones y medidas caseras de los alimentos según las recomendaciones de la Dieta Atlántica, que tienen mayor probabilidad de contener residuos de antibióticos.**

Grupos de alimentos	Peso (g)
<b>Lácteos y derivados</b>	
Leche	200-250ml
Yogur	125g
Queso fresco, semicurado, curado y requesón	50g
Quesitos	18g
<b>Pescado y mariscos</b>	
Lenguado, rapante, merluza, trucha, bacalao y atún	125-150g
Sardinas	140g
Calamar y langostinos	150g
Almejas y mejillones	65-70g
<b>Carnes magras</b>	
Ternera	100-150g
Pollo o conejo	100-125g
Cerdo (lomo)	100-125g
<b>Huevos y ovoproductos</b>	
Huevos	55-60g
<b>Embutidos</b>	
Jamón curado, york, cocido, de pavo y mortadela	20-25g
Chorizo, salchichón y lomo embuchado	40-60g
Salchicha Frankfurt	55g

**Fuente:** Grupos de alimentos y pesos tomadas de Obxectivos de saúde nutricional nos comedores universitarios na USC: Dieta Atlántica (Tojo y Leis, 2007).

### **1.3. HÁBITOS DIETÉTICOS GALLEGOS**

Tal y como ya se ha mencionado en apartados anteriores, uno de los factores que interviene de manera más importante en la diversidad y composición de la MI es el patrón dietético de la población (De



Filippo y col., 2010; Conlon y Bird, 2015). En el caso de nuestra comunidad, por desgracia actualmente no existen muchos datos acerca de la composición de la MI de nuestra población, a pesar de que tenemos una de las mayores prevalencias de sobrepeso y obesidad de todo el país, tanto en niños (Pérez Farinós y col., 2011) como en adultos, alcanzando una tasa de obesidad de alrededor del 25% de la población total (Aranceta-Bartrina y col., 2016). No obstante, Galicia registra un caso paradójico, ya que a pesar de dichas elevadas tasas de obesidad, las tasas de mortalidad derivadas de enfermedades cardíacas son claramente inferior a las del resto de España, siendo un 40% inferiores a la media nacional (Calvo-Malvar y col., 2016).

Todo ello, hace pensar que existe alguna característica diferencial en nuestra MI o bien en nuestra dieta que juega un papel importante en esta divergencia entre tasas de obesidad y tasas de enfermedades cardiovasculares, que normalmente, siguen un camino paralelo (Guallar-Castrillón y col., 2015). A este respecto, a imagen del trabajo realizado anteriormente con respecto a la Dieta Mediterránea, en las últimas décadas, se ha hecho un esfuerzo por caracterizar de un modo preciso la dieta tanto de Galicia como de la región norte de Portugal, ya que presentan grandes similitudes (Vaz Velho y col., 2016). En consecuencia, la dieta típica de dichas regiones se ha incluido dentro del concepto de Dieta Atlántica (DA), amparada en Galicia por la Fundación DA, declarada fundación de interés sanitario mediante la Orden del 11 de julio de 2007 y también de interés gallego mediante la Orden del 20 de septiembre de 2007.

La DA es un patrón dietético caracterizado por un alto consumo de pescados y mariscos, derivado de la gran importancia de la industria pesquera que tiene en la región Atlántica (Roca-Saavedra y col., 2017). Además, debido a las altas precipitaciones en la región, abundan los pastos verdes, lo que favorece la ganadería extensiva, tanto la carne roja procedente de ganado vacuno y los productos lácteos, fácilmente accesibles y por dicho motivo son habitualmente consumidos (Guallar-Castillón y col., 2013; Oliveira y col., 2010). Con respecto al consumo de otros grupos de alimentos, la DA también se caracteriza por una alta

ingesta de verduras y legumbres, sopas, patatas y pan integral (Oliveira y col., 2010; Vaz y col., 2016), mientras que el consumo de huevos y vino es moderado.

La DA también se caracteriza por una alta ingesta de alimentos de temporada, localmente frescos y mínimamente procesados, cocinados mediante recetas simples pero cuidadas (Oliveira y col., 2010; Vaz y col., 2016). El aceite de oliva es la grasa culinaria más empleada, tanto como aderezo como para el resto de las preparaciones culinarias (Calvo-Malvar y col., 2016), y con respecto a los métodos de cocción, los alimentos son comúnmente cocidos al vapor, hervidos, a la parrilla o guisados, con menos presencia de frituras que en otras regiones de España (Calvo-Malvar y col., 2016). Como resumen y guía de orientación, Tojo y Leis (2007) elaboraron la pirámide nutricional adaptada a la DA (Tojo y Leis, 2007) (**Figura 7**).



Figura 7. Pirámide de la Dieta Atlántica. Fuente: Tojo y Leis, 2007.

Debido a que en la DA se incluyen países con climatologías muy diferentes, tales como Portugal, Irlanda, Reino Unido, Bélgica, Holanda, Dinamarca, Noruega, Islandia y parte de España y Francia, aún dentro de estar amparadas dentro de un patrón común, existen diferencias en los patrones dietéticos entre dichos países que justifican una caracterización más específica. Entre dichos países, Portugal y Galicia (noroeste de España), debido a su influencia celta, son geográficamente, climáticamente y culturalmente similares (Calvo-Malvar y col., 2016), y sus hábitos alimenticios comunes se han definido de manera más específica a lo establecido en la DA dentro de la Dieta Atlántica del Sur de Europa (DASE) (Guallar-Castillón y col., 2013; Vaz y col., 2016). En la **Tabla 3**, ya mencionada anteriormente, se resumen de forma global las raciones de cada grupo de alimentos, según las recomendaciones de la DA.

### **1.3.1. Beneficios de la Dieta Atlántica del Sur de Europa**

Diversos estudios científicos han demostrado algunos beneficios concretos para la salud humana de los distintos componentes de los alimentos que conforman la DASE. En particular, tanto el consumo de pescado y otros productos del mar, de verduras, así como un bajo consumo de alcohol, típicos de la DASE, tienen efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardíacas y metabólicas. La vitamina B, los ácidos grasos Omega 3 y el yodo son tres componentes de la DASE, que tienen importantes funciones en el organismo y cuyo aporte en cantidad suficiente es esencial para mantener un correcto estado de salud (Vaz Velho y col., 2016). Además, la DASE aporta una amplia variedad proteica, con abundancia de los diferentes aminoácidos esenciales, y muchos compuestos bioactivos como son los antioxidantes (Tojo y Leis, 2008). En un estudio de casos y controles basado en la población de Porto, Portugal, se observó que una mayor adhesión a la DASE por parte de los pacientes se asoció con una menor probabilidad de infarto agudo de miocardio (Oliveira y col., 2010). Un alto grado de adhesión a esta dieta también se ha asociado con menores

concentraciones séricas de marcadores de inflamación, triglicéridos e insulina, un índice mejorado de resistencia a la insulina y una reducción de la presión arterial sistólica (Guallar-Castillón y col., 2013). Otros estudios han señalado beneficios de algunos componentes de los alimentos típicos de la DASE, pero no agrupados como una comida ni agregados bajo el concepto del patrón de la DASE (Vaz y col., 2016). De entre ellos, destaca un componente graso derivado de la clorofila (el ácido fitánico), que en los últimos años ha recibido una importante atención e incluso está siendo propuesto por algunos autores como nuevo compuesto graso funcional (Hellgren, 2010).

### 1.3.2. El ácido fitánico

Debido a las especiales características de la región Atlántica del Sur de Europa, como ya se ha descrito, en dicha región es abundante tanto el consumo de productos derivados de la pesca como el consumo de alimentos producidos por mamíferos rumiantes (Oliveira y col., 2010; Vaz y col., 2016). Por este motivo, en dicha región, conjuntamente con aquellas en las que predomina la Dieta Ártica, y algunos países asiáticos, es donde se produce el mayor consumo de todo el mundo de Ácido Fitánico (AF).

El AF (ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanoico) se define como un ácido graso de cadena ramificada isómero del ácido araquidónico (eicosanoico) con el que, sin embargo, tiene muy poco en común (Vetter and Schröder, 2011), en la **Figura 8** se muestra la molécula del Ácido Fitánico. El AF es el ácido graso ramificado más común en la dieta humana (Yepuri y col., 2014), y es el resultado de la degradación enzimática del fitol, que se escinde de la clorofila a, b y d y posteriormente oxidado por la microbiota del rumen y ciertos organismos marinos (Van den Brink y Wanders, 2006; Che y col., 2013).

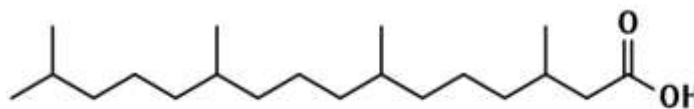


Figura 8. Molécula de ácido fitánico

### 1.3.3. Vía de degradación del fitol y síntesis del ácido fitánico

Estudios previos demostraron que el AF deriva exclusivamente de fuentes exógenas, ya sea como el propio ácido fitánico o bien en forma de ciertos precursores, en particular, el fitol (Van den Brink y Wanders, 2006). El fitol abunda ampliamente en la naturaleza porque es un constituyente obligatorio de la clorofila y está presente en las hojas verdes de las plantas y de los árboles. De hecho, la clorofila se sujeta a la membrana tilacoidal de los cloroplastos a través de la cadena de fitol. El fitol está unido al anillo de porfirina de la clorofila por medio de un enlace éster y representa un tercio de su peso molecular (Wanders y col., 2011) (**Figura 9**).

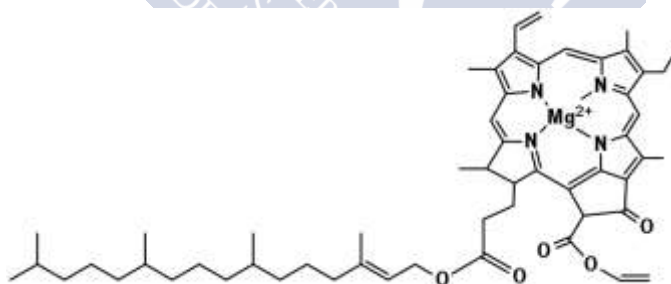


Figura 9. Molécula de clorofila.

Aunque desde hace muchos años el fitol era conocido como un precursor del AF, la vía bioquímica responsable de la conversión del fitol en AF se descubrió recientemente (Van den Brink y Wanders,

2006). El fitol se convierte primero en su aldehído y posteriormente se se convierte en AF.

La producción del AF está mediada por la enzima denominada aldehído deshidrogenasa (Van den Brink y Wanders, 2006). Estos autores sugirieron que, al menos en estudios con ratones, el fitol se convierte primero en AF y después puede reducirse para producir ácido pristánico (**Figura 10**) (Vetter y Schröder, 2011). Sin embargo, se ha descubierto otra vía, en que un alcohol derivado del fitol denominado dihidrofitol, también puede convertirse en AF y este alcohol ha sido detectado en el rumen de las vacas, pudiendo ser el resultado de procesos bacterianos (Van den Brink y Wanders, 2006).



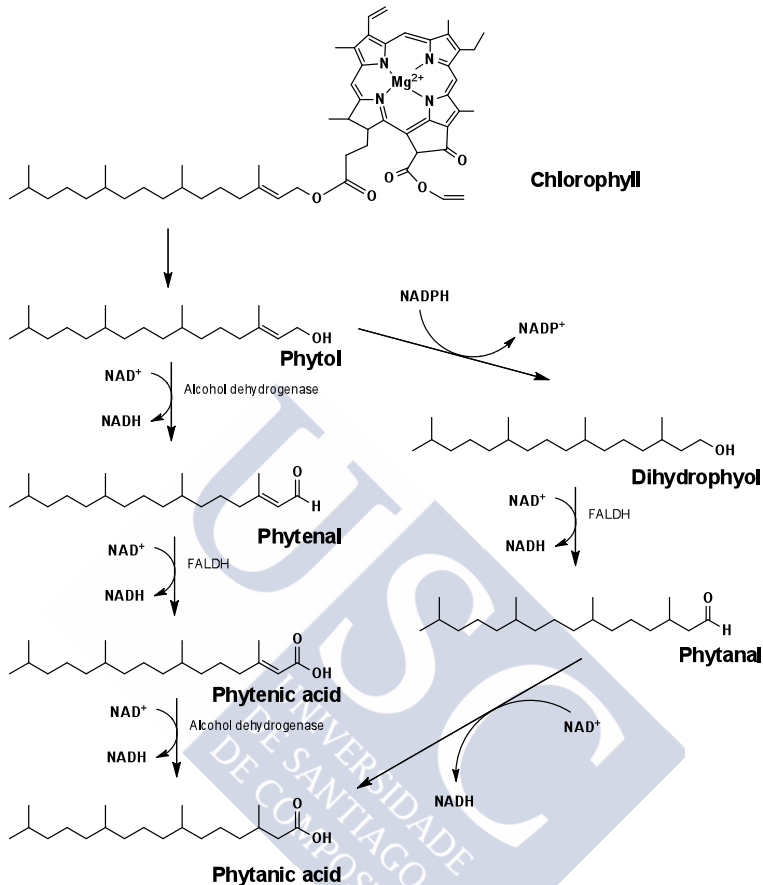


Figura 10. Vías de conversión de fitol en ácido fitánico. Fuente: Roca-Saavedra y col., 2017.

En los mamíferos, el AF aparece como un producto oxidado del fitol después de la ingestión de alimentos que contienen grasas de origen animal o vegetales, y su absorción en el intestino delgado (Elmazar y col., 2013). En cuanto a los alimentos marinos, el AF deriva de especies de fitoplancton, tales como algas y microalgas, que también contienen moléculas de clorofila. Dicha clorofila procedente del fitoplancton es metabolizada una vez ingerido por los diferentes

animales herbívoros marinos, con lo que el fitol, así como sus derivados, se depositan en los tejidos de los mismos. En última instancia esto da lugar a que dicha molécula esté presente a lo largo de la cadena alimentaria marina, como en los moluscos, peces y ballenas, y, en particular, en los aceites, grasas y derivados obtenidos de estas especies (Wander y col., 2011).

Otro aspecto interesante en la degradación del fitol a AF es que existen dos diastereómeros del AF en la naturaleza, uno con la nomenclatura de (-RRR) y otro (-SRR), presentes en los alimentos que contienen AF, si bien es cierto que la proporción entre ambos diastereómeros varía. El diastereómero -SRR es la forma predominante en los animales marinos y en los mamíferos terrestres aparece en mayor proporción la forma -RRR (Vreken y col., 1998). Sin embargo, un estudio reciente no encontró esta distribución, posiblemente debido a las mejores tecnologías de determinación comparadas con las empleadas previamente (Schröder y Vetter, 2011).

Además, el mismo estudio descubrió un mayor predominio del diastereómero -SRR en los grandes depredadores marinos, tales como la tortuga verde, el león marino o la marsopa, que en los encontrados en animales marinos utilizados comúnmente como alimentos, como por ejemplo el calamar, la trucha o la dorada (Schröder y Vetter, 2011). Curiosamente, también se descubrió que la distribución entre los diastereómeros del AF varía entre la leche bovina en función de su diferente origen, ya que la leche ecológica ofrece una mayor proporción del isómero -RRR en comparación con la leche convencional, que presenta mayor cantidad del diastereómero -SRR (Schröder y col., 2012), siendo este último diastereómero (-SRR) el que menos efectos tóxicos presenta a nivel del sistema nervioso central (Schröder y col., 2012).

#### **1.3.4. Metabolismo del ácido fitánico en los seres humanos**



La investigación sobre el AF comenzó en 1950, cuando los productos lácteos estaban siendo investigados por su contenido en ácidos grasos. Estos estudios revelaron que el AF es un constituyente principal de una variedad de productos alimenticios en la dieta humana, especialmente en productos derivados de animales de pastoreo (Van den Brink y col., 2006) y marinos (Wander y col., 2011). Después, se encontró que el AF es un ácido graso de 20 carbonos, compuesto de una cadena principal de 16 carbonos y cuatro grupos metilo adicionales. El interés por el AF aumentó considerablemente cuando se registraron niveles elevados de esta molécula en los tejidos de un paciente que sufría la enfermedad de Refsum. Una vez que se estableció que el AF se encuentra en cantidades muy elevadas en el plasma de estos pacientes, y se estableció como prueba bioquímica de diagnóstico fácil. Desde entonces, una concentración sérica elevada de AF es generalmente considerado como un marcador de la enfermedad de Refsum (Van den Brink y col., 2006). Por todo esto, hay que profundizar en el metabolismo que tiene lugar el AF en los seres humanos.

El metabolismo de este ácido graso puede producirse a través de  $\alpha$ -oxidación y  $\beta$ -oxidación (Nagai, 2015). La  $\alpha$ -oxidación que ocurre en algunas personas, se debe a una mutación de una enzima, denominada fitanil-CoA-2-hidroxilasa, que causa la enfermedad de Refsum, causando síntomas neurológicos, tales como retinitis pigmentosa, polineuropatía, y ataxia cerebelosa (Wright y col., 2012). En el ser humano la  $\alpha$ -oxidación sólo se produce en los peroxisomas, mientras que los peroxisomas y mitocondrias son capaces de  $\beta$ -oxidar ácidos grasos. La concentración de AF en el plasma de sujetos sanos varían entre 0.04-11.5  $\mu$ M (Al-Dirbashi y col., 2008), mientras que en los pacientes con enfermedad de Refsum varía entre 240 a 1.400  $\mu$ M (Nagai, 2015). Además de esto, una concentración sérica elevada de AF fue asociado con otras enfermedades, como el cáncer de próstata (Xu y col., 2005), la apoptosis de los astrocitos (Kahlert y col., 2005), patologías cardíacas (Monning y col., 2004), polineuropatía periférica (Wierzbicki y col., 2007), daño molecular oxidativo (Kataria y col.,

2015), daño del ADN (Wright y col., 2012), e implicado potencialmente en el linfoma de Hodgkin (Ollberding y col., 2013; Zomer y col., 2000).

Sin embargo, en los últimos años, al igual que otros derivados del fitol, se ha demostrado que el AF también puede tener un papel positivo en los seres humanos (Islam y col., 2015). De este modo, se ha sugerido que el AF y su metabolito principal, el ácido pristánico (ácido 2,6,10,14-tetrametilpentadecanoico) pueden tener un efecto protector contra el síndrome metabólico (Capuana y col., 2014; Hellgren, 2010), favorecer la diferenciación de los adipocitos de la grasa parda (Schlüter y col., 2000b), prevenir la diabetes tipo 2 (Hellgren, 2010), así como prevenir el cáncer de mama, colon y otros tipos de cánceres (Raplh y col., 2010). Como se puede observar, algunas de estas patologías tienen una menor prevalencia en la población gallega que en el caso de la media nacional, por lo que el elevado consumo de AF a través de la DASE, podría estar jugando un papel importante. En consecuencia, dado que las funciones del AF en la salud de las personas que ingieren concentraciones elevadas de éste siguen siendo poco claras, y el elevado consumo de este compuesto graso por parte de la población en nuestra comunidad, es necesario profundizar en el conocimiento acerca de sus efectos sobre la salud humana.



## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como finalidad principal, evaluar los efectos que los antibióticos ingeridos a bajas concentraciones, en forma de residuos contenidos en los alimentos, pueden tener sobre la microbiota intestinal humana. No obstante, paralelamente, también se ha realizado otro tipo de investigaciones que constituyen un complemento importante y que son de gran interés para determinar el por qué de la especial situación de la población gallega respecto al sobrepeso.

De este modo, los objetivos específicos planteados podemos enumerarlos de la siguiente manera:

1. Determinación de la composición de la microbiota intestinal en una muestra de la población gallega.
2. Estudio del papel que componentes específicos de la Dieta Atlántica pueden tener sobre la salud de la población gallega.
3. Determinación *in vitro* de los efectos de antibióticos a concentraciones incluidas en los LMR sobre la microbiota intestinal humana.
4. Determinación *in vivo* de los efectos de antibióticos a concentraciones incluidas en los LMR sobre la microbiota intestinal de animales de experimentación.
5. Determinación *in vitro* de los efectos de extractos polifenólicos a las concentraciones habitualmente empleadas como prebióticos sobre la microbiota intestinal humana.





# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los métodos empleados en cada uno de los objetivos descritos siguieron una metodología específica, que se detalla a continuación. Los métodos de identificación bacteriana por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), fueron comunes para todos los estudios, por lo que se describen al final.

#### ***3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN Y ESTILO DE VIDA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PERSONAS DE LA POBLACIÓN GALLEGA***

Para el presente ensayo fueron reclutadas personas residentes en Galicia de edades comprendidas entre los 18 y los 65 años de edad, con capacidad e independencia para responder los cuestionarios. Además, en dicho estudio fue estudiada la relación de diversas variables con posibles diferencias en algunos grupos bacterianos mayoritarios en la MI de los sujetos.

##### **3.1.1. Sujetos participantes**

Como se mencionó en el apartado anterior, fueron incluidos en el ensayo hombres y mujeres residentes de la Comunidad Autónoma de Galicia, reclutados mediante anuncio público e inclusión voluntaria durante el período 2015-2016. Todas las determinaciones se llevaron a cabo tras aceptación de las condiciones de estudio, por parte de todos los participantes, a través de un consentimiento informado. El estudio se desarrolló con 31 voluntarios a los que se les asignó un código aleatorio para preservar su intimidad, 9 de ellos fueron hombres y 22 mujeres, con una media de edad de  $28,3 \pm 9,73$  años y sin patologías declaradas, por lo que se considera que se trataba de individuos sanos. Como criterios de exclusión, no se aceptaron sujetos que en los últimos 6 meses hubiesen ingerido pre- o probióticos en presentación farmacológica, antibióticos, glucocorticoides o medicamentos inmunosupresores. Todos los procedimientos fueron realizados por personal cualificado de acuerdo al código de buenas prácticas médicas, la declaración de Helsinki para la realización de ensayos biomédicos y los datos obtenidos fueron tratados de acuerdo a la legislación española (Ley 15/1999) de protección de datos de carácter personal. La toma de muestras empleadas para este estudio fue autorizada por el Comité de Bioética del Servicio Gallego de Salud (SERGAS), autorización número 119/2014.

### 3.1.2. Variables estudiadas

Mediante una entrevista personal, se realizó un Cuestionario de Recogida de Datos (CRD), que comprende los siguientes documentos:

- **Consentimiento informado**, mediante el cual los sujetos participantes aprobaron o rechazaron su participación, además de la inclusión del conocimiento de la información personal de sus resultados.
- **Cuestionario de datos socio-demográficos y antecedentes personales (enfermedades, toma de algún medicamento, probiótico, prebiótico...)**. Dicho cuestionario se realiza con el fin de comprobar de

modo fehaciente el correcto cumplimiento de los criterios de inclusión establecidos para el estudio.

- **Valoración de la ingesta dietética**, el método para la recogida de información de la ingesta de macro- y micronutrientes se recogió mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, compuesto por 13 grupos de alimentos en el cual se incluyeron 113 alimentos diferentes. Mediante dicho cuestionario, se les preguntó a los sujetos ítem por ítem la frecuencia con la que consumían dicho producto y la cantidad en la que lo hacían. Para poder asegurar que la información era lo más ajustada a la realidad posible, se les mostró diferentes fotografías con distintas porciones de cada uno de los alimentos para que los participantes indicasen su consumo de la forma más aproximada posible, empleando las láminas de porciones de alimentos a tamaño real (Russolillo y Marques-López, 2011). Para cada uno de los alimentos consumidos, las cantidades se registraron en unidades domésticas, bien por volumen, por cucharadas, etc. Se prestó una especial atención al modo de cocinado y cantidad de ingredientes utilizados en cada preparación (p.ej. tipo de aceite o leche utilizada). Una vez recogidos los datos se calcula la ración media consumida por los sujetos en estudio, así como la composición nutricional de la misma, mediante el programa informático Easy diet® versión 1.0 (Biocentury, Barcelona, España). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  desviación estándar en gramos o kilocalorías / día.

- **Edad y medidas antropométricas**, con el individuo descalzo y ropa ligera, se describió el peso, talla, IMC y perímetro abdominal, además de preguntársele por su edad. En base a las respuestas y medidas antropométricas obtenidas, los sujetos fueron clasificados en 3 diferentes grupos de edad ( $\leq 20$  años, 20-30 años y  $\geq 30$  años) y de IMC ( $\leq 20$  IMC, 20-30 IMC y  $\geq 30$  IMC), a fin de determinar la influencia de dichos parámetros en la MI de los sujetos. Las medidas antropométricas de peso y altura fueron realizadas mediante un analizador de la composición corporal InBody 320 (Biospace, Seúl, Korea del Sur) y un tallímetro Biospace 170 (Biospace), respectivamente. Las medidas de peso corporal y altura fueron tomadas con una precisión de 0,1 kg y 0,1 cm, respectivamente, y fueron tomadas medidas a cada uno de los sujetos por triplicado. El índice de

masa corporal fue determinado mediante la fórmula tradicional de peso/altura<sup>2</sup>.

- **Factores relacionados con el estilo de vida**, durante la entrevista, se registraron también otros factores relacionados con el estilo de vida de cada uno de los sujetos/voluntarios: alergias e intolerancias alimentarias, consumo de tabaco, alcohol, actividad física, hora de acostarse o horas de sueño. En cuanto al consumo de tabaco, por ejemplo, los sujetos se clasificaron en no fumadores (incluyendo ex-fumadores y fumadores ocasionales) y aquellos que si fuman de forma habitual. Aquellos sujetos que indicaron que no hacían ejercicio físico, se clasificaron como físicamente inactivos y aquellos que consumían alcohol a menudo se les consideraron consumidores habituales de alcohol.

- **Adherencia a la DASE**, para comprobar el grado de adherencia de los diferentes sujetos a la DASE, se utilizó un cuestionario de ítems (**Tabla 6**) en el cual en función de la adecuación de su dieta al patrón atlántico se les puntuó con 0 ó 1 puntos. Los sujetos que obtuvieron según dicho formulario una puntuación igual o superior a 6 puntos fueron considerados como “alta adherencia a la DASE”, los que se situaron entre 3-6 puntos, fueron considerados como “sujetos con adherencia media a la DASE” y aquellos que obtuvieron una puntuación inferior a 3 fueron considerados como “baja adherencia a la DASE”.

**Tabla 6: Cuestionario de adherencia a la Dieta Atlántica del Sur de Europa empleado**

PREGUNTA	MODO DE VALORACIÓN	PUNTOS
¿Cuántas raciones de patatas consume a la semana?	3 o más=1 Punto	
<i>(Ración 150-200g, no incluye patatas fritas)</i>		

¿Cuántas raciones de verduras, hortalizas y legumbres consume al día?	2 o más= 1 punto
<i>(Ración 300g)</i>	
¿Cuántas raciones de leche y derivados consume al día?	2 o más= 1 punto
<i>(Ración leche y yogur 200-250g/ queso curado 40-60g y queso fresco 80-120g)</i>	
¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día? <i>(Ración 100-150g)</i>	1 ración=1 punto
¿Acompaña regularmente las comidas con vino?	1-2 vasos =1 punto
¿Cuántas raciones de pescado fresco o marisco consume a la semana? <i>(Ración 125-150g)</i>	3 o más=1 punto
¿Cuántas raciones de bacalao consume al día?	3 o más= 1 punto
¿Cuántas raciones de pan integral consume al día?	1 o más= 1 punto
¿Cuántas veces al mes consume caldo gallego o similar?	1 o más= 1 punto

#### **PUNTUACIÓN OBTENIDA**

Fuente: Guallar-Catrillón y col., 2013.

### **3.1.3. Recogida y tratamiento de las muestras de heces**

Cada participante entregó una muestra (entre 10-30 g por sujeto) recogida en un anaclín estéril hermético dentro de una bolsa con cierre hermético (Seward, Worthing, Reino Unido) dentro de la cual también se había introducido con un sobre generador de anaerobiosis GENbox anaer 96124 (Biomérieux, Marcy L'Etoile, Francia). Las muestras así recolectadas fueron transportadas al laboratorio en refrigeración donde se mantuvieron a una temperatura controlada de  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento, que se realizó en un plazo máximo de dos horas tras su recepción. La primera preparación realizada consistió en diluir las muestras en una proporción 1:10 en tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), ajustado a un pH 7,2-7,4, y posteriormente homogeneizadas en una bolsa estéril con un Masticator®

(AES, Counbourg, Francia) durante 5 min. Las muestras así homogeneizadas se transvasaron a tubos de ensayo estériles tapados y se mantuvieron en congelación hasta su uso.

#### **3.1.4. Determinación y cuantificación bacteriana mediante PCR**

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando 1 mL de cada una de las muestras mediante un kit comercial (Realpure Microspin, Durviz S. L., Valencia, España) (**Figura 11**) siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura 11.** Kit y materiales empleados para la extracción de ADN

Una vez extraído el ADN de las muestras, se procedió a la cuantificación de los distintos tipos de grupos bacterianos incluidos en el estudio, para los que se emplearon las sondas específicas que se señalan en la **Tabla 7**. Todas las mezclas se llevaron a cabo basándose

en el método publicado por Murri y col. (2013), utilizando dichas sondas y el fluorocromo Syber Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Reino Unido).



Tabla 7. Condiciones empleadas en la PCR cuantitativa en tiempo real para la determinación de los grupos bacterianos estudiados

Grupo bacteriano	Sondas	Cepa Referencia	Condiciones de cultivo	Tamaño amplicón (bp)	Temperatura anillado (°C)	Referencia
Microbiota total	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	<i>Clostridium perfringens</i> CECT376	Caldo RCM, 37°C, 48h, anaerobio	200	60	Fierer y col. (2005)
Firmicutes	F: ATGTGGTTTAATTCGAAGCA R: AGCTGACGACAACCATGCAC	<i>Clostridium perfringens</i> CECT376	Caldo RCM, 37°C, 48h, anaerobio	126	60	Guo y col. (2008)
Bacteroidetes	F: CATGTGGTTTAATTCGATGAT R: AGCTGACGACAACCATGCAG	<i>Bacteroides vulgatus</i> LMG 17767	Caldo nutritivo+ 5% sangre de cordero, 37°C, 48h, anaerobio	126	60	Guo y col. (2008)
Actinobacteria	F: GCGKCCTATCAGCTTGTT R: CCGCCTACGAGCYCTTTACGC	<i>Bifidobacterium longum</i> CECT 4503	Caldo MRS+ 0.05%Cys, 37°C, 48h, anaerobio	333	60	Hermann-Bank y col. (2013)



Proteobacteria	F: CATGACGTTACCCGAGAAGAAG R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	<i>Enterobacter cloacae</i> CECT 194	Caldo nutritivo, 30°C, 24h, aerobio	195	63	Friswell y col. (2010)
<i>Bifidobacterium</i>	F: CTCCTGGAAACGGGTGG G: GGTGTTCTCCCGATATCTACA	<i>Bifidobacteriu m longum</i> CECT 4503	Caldo MRS+ 0.05%Cys, 37°C, 48h, anaerobio	550	58	Matsuki y col. (2004)
<i>Bacteroides</i>	F: GAGAGGAAGGTCCCCAC R: CGCTACTTGGCTGGTTCAG	<i>Bacteroides vulgatus</i> LMG 17767	Caldo nutritivo+ 5% sangre de cordero, 37°C, 48h, anaerobio	106	60	Layton y col. (2006)
<i>Lactobacillus</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSMZ 20016	Caldo MRS 37°C, 24h, aerobio	341	58	Heilig y col. (2002)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; Cys: cisteína; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares); LMG: Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent (Ghent, Belgica); MRS: De Man, Rogosa and Sharpe; RCM: Reinforced Clostridium Medium.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en duplicado, siendo el volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y conteniendo 2  $\mu\text{L}$  de ADN y una concentración de 100 nM de cada una de las sondas (**Tabla 7**). Las condiciones de la RT-qPCR, llevadas a cabo en el equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) (**Figura 12**) fueron las descritas previamente por Murri y col. (2013) ligeramente modificadas. Así, el primer paso consistió en una etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min seguida de una etapa de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 s y temperatura óptima de anillado durante 1 min y, finalmente un análisis de las curvas de fusión mediante enfriamiento a 60°C (0.05 °C por ciclo) con una medida simultánea de la intensidad del fluorocromo Syber Green. La determinación del punto de fusión permitió la confirmación de la especificidad de la amplificación de los productos. Además, para cada uno de los experimentos se incluyeron controles negativos que contenían todos los reactivos con la excepción de ADN para asegurarnos la correcta amplificación en cada una de nuestras muestras. Una vez realizada la reacción de RT-qPCR, la concentración bacteriana para cada una de las muestras y los grupos objeto de estudio, se calculó mediante la comparación de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos previamente para las curvas estándar (Software 7000 Sequence Detection System, SDS, Applied Biosystems).



**Figura 12.** Equipo de PCR cuantitativa en tiempo real ABI PRISM 7000

Para la cuantificación de cada uno de los grupos bacterianos estudiados se elaboró una curva de calibración estándar, utilizando diluciones decimales de ADN bacteriano (de conocida concentración) obtenidas a partir de cultivos puros de cepas de referencia, según lo señalado en la **Tabla 7**. Las cepas se pusieron a crecer en el medio de cultivo de referencia bajo sus condiciones óptimas de crecimiento y se realizaron diluciones decimales para su posterior recuento en placa, empleando los medios de cultivo más adecuados para cada una de las especies. Una vez hecho el recuento se extrajo el ADN del tubo madre y se cuantificó el ADN mediante fluorescencia utilizando el fluorímetro Qubit Fluorometer (Invitrogen, Oregon, MI, USA) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Fluorímetro empleado para la cuantificación de ADN

Cada una de las curvas se normalizó al número de copias del gen 16S rRNA para cada una de las especies. En cada determinación, se emplearon controles negativos que contenían todos los elementos de la mezcla excepto la alícuota de ADN, y en ningún caso fue detectada reacción positiva. Los datos, finalmente se expresaron como una media de los valores duplicados obtenidos en los análisis. La eficiencia de la reacción para todos los pares de sondas se determinó utilizando la pendiente de la curva de calibrado obtenida para cada uno de los grupos bacterianos analizados, siendo esta eficiencia  $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ .

Los pares de sondas demostraron una eficiencia en el rango entre el 95% ( $E = 1,9$ ) y el 104% ( $E = 2,07$ ) y valores de pendiente en el rango de -3,59 a -3.16. Los resultados positivos fueron obtenidos mediante series de curvas tal y como se muestra en la **Figura 13**.

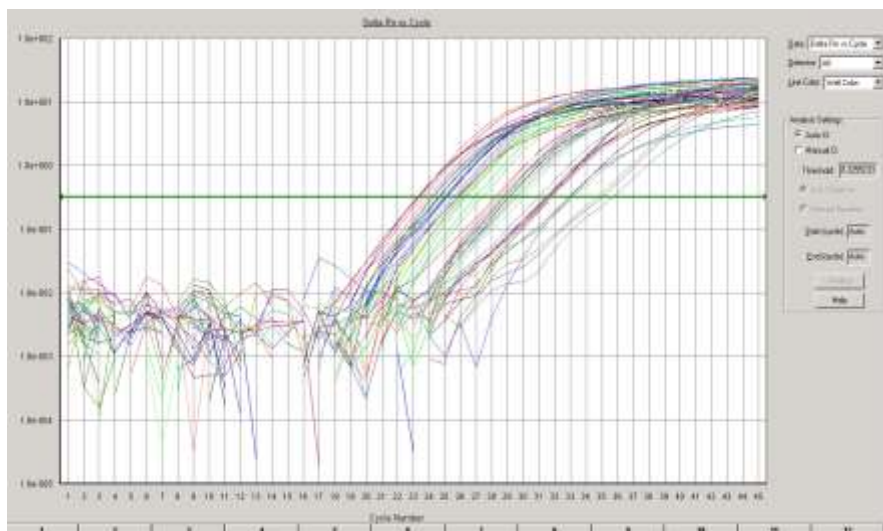


Figura 13. Representación de las curvas obtenidas en la cuantificación de Bacteroidetes

### **3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO FITÁNICO EN LA SALUD DE LOS CONSUMIDORES EN EL MARCO DE LA DIETA ATLÁNTICA DEL SUR DE EUROPA**

Para la determinación del estudio de la influencia del ácido fitánico en la salud de los consumidores en el marco de la DASE, se realizó una revisión bibliográfica a través de los buscadores de información científica a los que está suscritos la Universidad de Santiago de

Compostela. Mediante estos buscadores se accedió en la mayor parte de los casos a las revistas científicas consultadas. En los casos en los cuales los trabajos habían sido publicados en revistas u otras fuentes a las cuales la USC no estaba suscrita, se pidió una copia al autor, bien a través del correo electrónico correspondiente o bien a través de la plataforma ResearchGate (ResearchGate GmbH, Berlín, Alemania).

Con este objetivo, se han introducido las siguientes palabras clave en las bases de datos Scopus<sup>®</sup> (Elsevier, Amsterdam, Holanda) y en la Web of Knowledge<sup>®</sup> (Thompson Reuters, Philadelphia, USA): “Phytanic acid”, “phytol derivatives”, “Refsum syndrome”, “Zellweger syndrome”. Tras dicha revisión bibliográfica se han encontrado más de 1.600 publicaciones científicas, de las cuales han sido seleccionadas las publicadas en los últimos cinco años (como medida para evitar incluir informaciones ya obsoletas) así como los documentos más antiguos que se encuentran entre los 25 más citados de todos los consultados. Tras eliminar duplicados y excluyendo aquellas que no figuraban incluidas en los criterios anteriormente señalados, se procedió a la revisión y la integración de la información de un total de 136 artículos científicos. La información contenida en los mismos fue recopilada, traducida, resumida y utilizada de manera discrecional.

### ***3.3. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS IN VITRO DE LOS ANTIBIÓTICOS A CONCENTRACIONES INCLUIDAS EN LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL***

A fin de comprobar los efectos de bajas concentraciones de antibióticos sobre la MI, se diseñaron dos tipos de ensayos *in vitro*. El primero de ellos se realizó poniendo en contacto bajas concentraciones de antibióticos con cepas conocidas de diversos cultivos puros, a fin de determinar si dichas concentraciones de antibióticos son suficientes

para causar algún tipo de inhibición en el crecimiento de dichas cepas. Posteriormente, se pusieron en contacto los mismos antibióticos con la MI procedentes de heces humanas de tres voluntarios diferentes, en un modelo de simulación de la fermentación colónica distal.

Para estos ensayos, teniendo en cuenta que en Europa las tres familias de antibióticos más empleados en medicina veterinaria son las tetraciclinas, los  $\beta$ -lactámicos y las sulfamidas (Grave y col., 2014), se seleccionó para dichas pruebas un representante de cada una de dichas familias, la tetraciclina en el caso de las tetraciclinas, la amoxicilina en el caso de los  $\beta$ -lactámicos y la sulfadiazina en el caso de las sulfamidas. Como concentraciones de referencia, dado que nuestra intención es comprobar los posibles efectos en la MI como consecuencia de su ingesta como contaminantes alimentarios, se seleccionó concentraciones dentro de los LMR establecidos mediante el Reglamento 37/2010 para dichos antibióticos en músculo (100  $\mu\text{g/kg}$  en el caso de la tetraciclina y la sulfadiazina y 50  $\mu\text{g/kg}$  en el caso de la ampicilina) y teniendo en cuenta la ingesta semanal recomendada de los alimentos, en el marco de la DA (Tojo y Leis, 2007).

### **3.3.1. Determinación de los efectos *in vitro* de los antibióticos sobre cultivos puros**

Los antibióticos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Para la preparación de las diluciones, cada uno de los antibióticos se pesó en un tubo de vidrio previamente esterilizado en una autoclave (Raypa, Barcelona, España), a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió agua desionizada para su dilución, y posteriormente se diluye con agua Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). Una vez realizada la dilución mediante agitación en baño de ultrasonidos (Raypa, Barcelona, España), esta se esterilizó mediante filtración con una membrana estéril Acrodisc® de 0.22  $\mu\text{m}$  (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA). Una vez esterilizado, se procedió a su dilución en agua desmineralizada hasta obtener las concentraciones de

100  $\mu\text{g/kg}$  en el caso de la tetraciclina y la sulfadiacina y 50  $\mu\text{g/kg}$  en el caso de la ampicilina, que se emplearon para realizar las pruebas de inhibición.

Para determinar los efectos de dichas concentraciones de antibióticos sobre la MI, se seleccionaron un total de 12 cepas bacterianas, representativas de la MI humana (**Tabla 9**). Todas las cepas fueron obtenidas de la colección española de cultivos tipo (CECT, Burjassot, España) o del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania). En todos los casos, tras su llegada al laboratorio las cepas fueron reconstituídas siguiendo las instrucciones del fabricante y mantenidas congeladas en criobolas (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Previo a su utilización, cada una de las cepas incluidas en el estudio, fueron reconstituídas empleando el medio de cultivo, así como la temperatura de incubación y el tipo de atmósfera ideal para cada una de ellas, según se describe en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Cepas bacterianas empleadas, fuente, origen y condiciones de cultivo

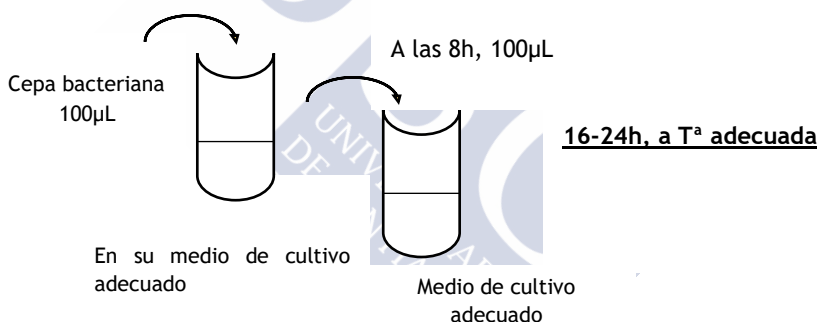
Cepas	Fuente	Origen	Condiciones
<i>Lactobacillus reuteri</i> 20016	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	Intestino humano (adulto)	Caldo MRS 37°C, 24h, aerobio
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299-V	PROBI AB (Lund, Suecia)	Intestino humano (adulto)	
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAFTI® L26	DSM (Moorebank, NSW, Australia)	Productos lácteos	
<i>Lactobacillus brevis</i> D-24	ESB- UCP, (Oporto, Portugal)	Aislado del caqui	
<i>Lactobacillus casei</i> 431	Christian Hansen (Hørsholm, Dinamarca)	Heces de niño	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 20021	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	Productos lácteos, aguas residuales, humanas y clínicas	
<i>Lactobacillus salivarius</i> 20555	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	Saliva humana	



<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI® L10	DSM (Moorebank, NSW, Australia)	Productos lácteos	Caldo MRS, 37°C, 24h, aerobio facultativo
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp <i>Longum</i> 15707	ATCC (Manassas, VA, USA)	Heces humano adulto	Caldo MRS+ 0.05%Cys, 37°C, 48h, anaerobio
<i>Clostridium perfringens</i> 376	CECT (Valencia, España)	Intestino bovino	Caldo RCM, 37°C, 48h, anaerobio
<i>Bacteroides vulgatus</i> 17767	BCCM (Bruselas, Bélgica)	Heces humano adulto	NB+ 5% sangre de cordero, 37°C, 48h, anaerobio
<i>Enterobacter Cloacae</i> 194	CECT (Valencia, España)	Líquido espinal humano	Caldo nutritivo, 30°C , 24h, aerobio

ATCC: American Type Culture Collection; BCCM: Belgian Coordinated Collections of micro-organisms; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; Cys: cisteína; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares); ESB-UCP: Escola Superior de Biotecnología da Universidade Católica de Porto; MRS: De Man, Rogosa and Sharpe; RCM: Reinforced Clostridium Medium.

Para la determinación de la acción de los tres antibióticos seleccionados sobre el crecimiento bacteriano con cultivos puros (el procedimiento es el mismo para todas las bacterias estudiadas), se realizó inicialmente un pre-inóculo con la cepa en estudio en su caldo de cultivo específico. De este modo, se inocularon para cada una de las cepas, 1-2 criobolas almacenadas en congelación en 10 mL de su caldo de cultivo. Posteriormente, dicho caldo con las criobolas se dejó incubar durante 8-12h a la temperatura ideal de la cepa bacteriana (entre 30-37°C, **Tabla 9**), a fin de potenciar su crecimiento exponencial. Pasadas dichas 8-12h se traspasaron 100  $\mu$ L del caldo inoculado e incubado, a otro tubo estéril con caldo de cultivo (10 mL) para favorecer el máximo crecimiento bacteriano (**Figura 12**).



**Figura 12. Procedimiento de reconstitución y crecimiento exponencial de cultivos puros tras su congelación.**

Una vez obtenido un crecimiento exponencial de los inóculos, se determinó mediante recuento en placa la concentración (ufc/mL) de bacterias obtenidas para cada uno de los inóculos, a fin de realizar los posteriores estudios empleando una concentración de cada una de las cepas estudiadas similar a los que habitualmente habitan en el colon humano (**Tabla 10**). Para este fin, se emplearon agar nutritivo para el recuento de *Enterobacter cloacae*, agar NB para el recuento de

*Bacteroides vulgatus*, agar RCM para el recuento de *Clostridium perfringens* y agar MRS para el resto de cepas estudiadas.

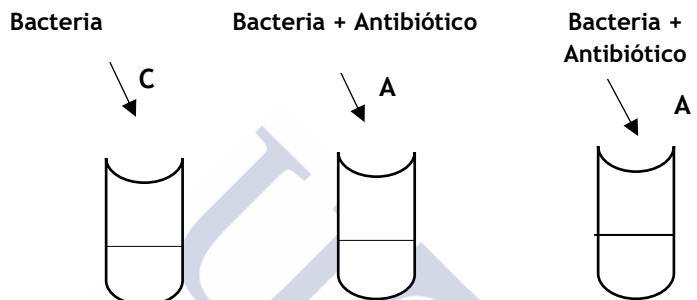
**Tabla 10. Concentración habitual de las especies bacterianas en el intestino de un adulto sano**

Cepa bacteriana	Concentración colónica	Referencia
<i>Lactobacillus spp.</i>	$10^5$ - $10^6$	Delgado y col. (2007)
<i>Clostridium spp.</i>	$10^6$ - $10^7$	Galley y col. (2014)
<i>Bacteroides spp.</i>	$10^8$	Cerdó y col. (2007)
<i>Enterobacter spp.</i>	$10^8$	Galley y col. (2014)
<i>Bifidobacterim spp.</i>	$10^6$ - $10^7$	Khonsari y col. (2016)

Una vez se determinaron las concentraciones que alcanza cada una de las cepas empleadas, tras su incubación en caldo de cultivo durante 16-24h, se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el volumen de cada cepa que debimos inocular para obtener una concentración según lo descrito en la **Tabla 10**.

De tal manera que, pasadas 16-24h se incorporó una cantidad determinada por triplicado de cada cepa en tres tubos estériles con medio líquido. Dos de ellos contenían la concentración de antibiótico en estudio (100 µg/kg en el caso de la tetraciclina y la sulfadiacina y 50

$\mu\text{g/kg}$  en el caso de la ampicilina) y otro actuó como control, no llevando antibiótico. Tras su inoculación, dichos tubos se dejaron en incubación durante el tiempo y temperatura considerada óptima para cada una de las cepas, según lo descrito en la **Tabla 9 (Figura 13)**.



**Figura 13.** Inoculación por triplicado de las cepas en estudio en el caldo de cultivo inoculado con antibióticos y control.

Tras dicho período se realizaron diluciones decimales en agua de peptona tamponada (Merck, Darmstad, Alemania) y se procedió a su siembra en medio sólido por duplicado a fin de determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias/mL (ufc/mL) en los cultivos controles y en los llevaban antibiótico adicionado explicado en la **Figura 14**. En base a las diferencias obtenidas (expresados en log ufc/mL), se realizó la comparación estadística a fin de determinar si existían diferencias significativas.

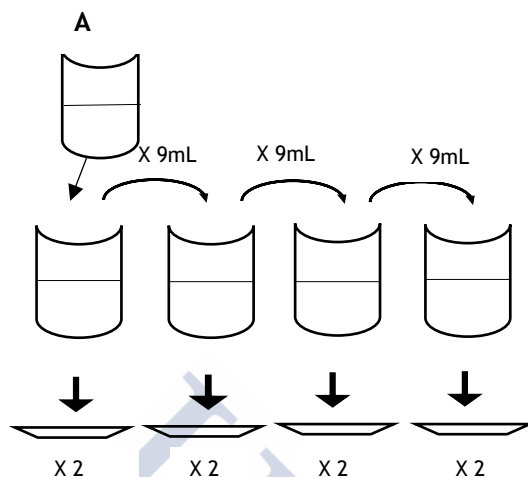


Figura 14. Esquema de diluciones y siembra empleado.

### 3.3.2. Determinación de los efectos *in vitro* de los antibióticos sobre cultivos mixtos

A fin de complementar los resultados obtenidos sobre cultivos puros, en caldo de cultivo y sin existir interacciones con otro tipo de materiales presentes en el colon más que las propias bacterias, se procedió a la comprobación de los efectos de los antibióticos estudiados sobre muestras reales de heces humanas. Estas muestras fecales fueron introducidas en un sistema de fermentación que simula la parte distal del colon humano, tal y como se describe a continuación.

#### 3.3.2.1. Recolección de las muestras humanas de heces

Para los ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos se emplearon inóculos de heces humanas. Las muestras de heces humanas se recogieron de tres sujetos voluntarios humanos que no habían

tomado antibióticos, ni pre- ni pro-bióticos durante al menos los 6 meses anteriores al ensayo y sin ningún tipo de desorden gastrointestinal. Así, 3 voluntarios (dos mujeres y un hombre) con una edad comprendida entre 32 y 50 años donaron una muestra de heces (previa firma de consentimiento informado). Se adoptaron ciertas precauciones estipuladas en las guías de buena práctica médica y la declaración de Helsinki, entre ellas la necesidad de obtener un consentimiento informado y del seguimiento de ciertas declaraciones éticas y de protección y custodia de los datos obtenidos que se detallan a continuación.

#### **3.3.2.2. Declaraciones éticas**

Todas las determinaciones se llevaron a cabo tras aceptación de las condiciones de estudio, por parte de todos los participantes, a través de la firma de un consentimiento informado. El estudio se desarrolló con 3 voluntarios a los que se les asignó un código aleatorio para preservar su intimidad. La firma del consentimiento informado para la toma de heces fue realizado por personal cualificado y el uso de los datos obtenidos seguirá las normas recogidas en la Ley Española (15/1999) de protección de datos de carácter personal.

#### **3.3.2.3. Evaluación del crecimiento bacteriano en cultivos mixtos con muestras fecales humanas**

Los ensayos se llevaron a cabo simulando las condiciones del colon distal humano, que es la parte del cuerpo que posee una mayor cantidad y diversidad de grupos bacterianos (Conlon y Bird, 2015) y donde se produce la mayor parte de los desórdenes gastrointestinales. El medio de cultivo (250 mL por prueba) utilizado fue el descrito por Macfarlane y col. (1998). Su composición (g/L de agua destilada) consistió en: 5 g almidón, 2 g de pectina, 1 g de goma guar, 4 g de mucina (porcina

gástrica tipo III), 2 g de xilano, 2 g de arabinogalactano, 1 g de inulina, 3 g de caseína bovina, 5 g de peptona (Merck, Alemania), 5 g de triptona, 0,4 g de sales biliares, 4,5 g de extracto de levadura (Panreac, Barcelona, España), 4,5 g de NaCl (Panreac), 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (BDH), 1,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Steiheim, Alemania), 0,15 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma-Aldrich, Steiheim, Alemania), 1 g de Tween 80 (Panreac), 0,05 g de hemina (Sigma-Aldrich) y 0,8 g de cisteína HCl. Dicho medio de cultivo se introdujo en un sistema de simulación *in vitro* del colon distal (**Figura 15**) y se inoculó con 2,5 mL de una muestra homogeneizada de heces (1% p/v) diluida en tampón fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) (1:10).

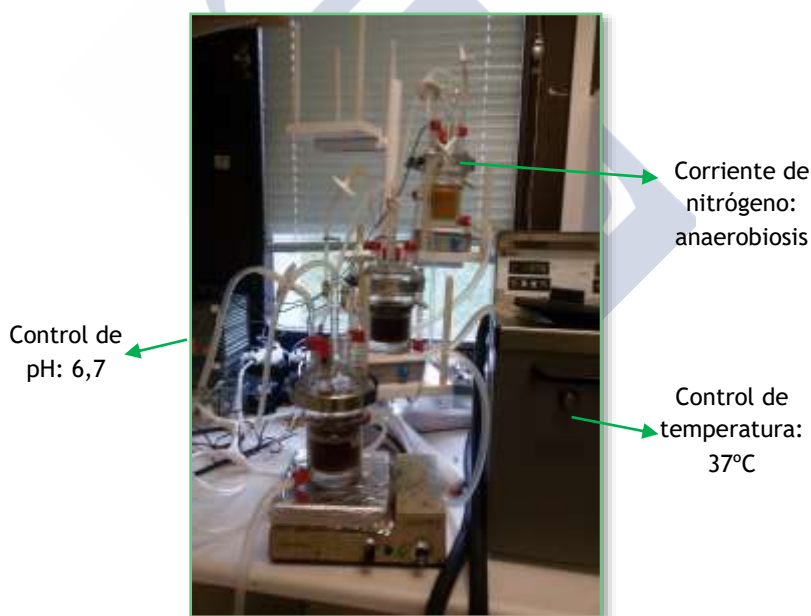


Figura 15. Sistema de simulación *in vitro* del colon distal por triplicado

#### 3.3.2.4. Preparación de antibióticos

Los antibióticos empleados fueron tetraciclina, sulfadiacina y ampicilina, y las concentraciones empleadas 100, 100 y 50 $\mu$ g/60kg persona/día, respectivamente. Dichas concentraciones se determinaron teniendo en cuenta los niveles máximos permitidos en alimentos según la legislación europea (Reglamento UE 37/2010) y teniendo en cuenta la ingesta semanal recomendada de los alimentos, en el marco de la DA (Tojo y Leis, 2007).

Posteriormente, se le añadió al medio ya inoculado con las heces procedentes de los voluntarios (1 g por persona) la cantidad correspondiente del antibiótico preparado y diluido hasta obtener la cantidad necesaria. Las condiciones de ensayo fueron las correspondientes a las del colon distal, en anaerobiosis generada mediante un suministro continuo de nitrógeno libre de oxígeno (Praxair, Madrid, España). La temperatura se mantuvo constante a 37 °C a través de un baño termostático (Pharmacia Biotech, Holanda), a partir del cual se envía agua atemperada a las camisas de los vasos de ensayo. El pH se mantuvo constante a 6,5, controlado mediante un regulador de pH (Crison, Barcelona, España). Las tomas de muestras se hicieron a las 0 y 24 horas de ensayo, en las cuales se tomó una muestra de 3 mL de volumen, y se determinaron las diversas fracciones estudiadas de la microbiota (siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.4), y la concentración de ácidos grasos de cadena corta, según se describe en el apartado siguiente.

### ***3.4. ENSAYOS IN VIVO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS ANTIBIÓTICOS SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN***

#### **3.4.1. Animales de experimentación**



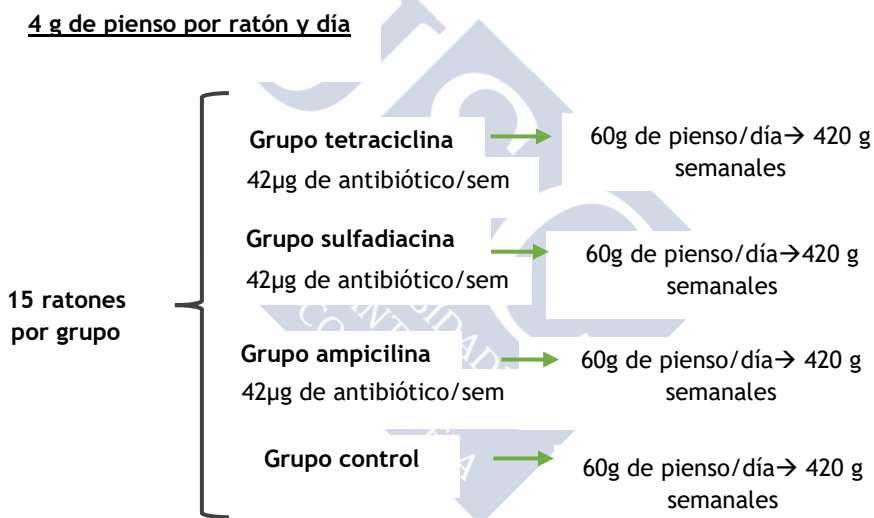
Para la realización de ensayos *in vivo* empleamos un total de 14 semanas en el que se administraron los tres antimicrobianos citados a dosis permitidas por la legislación. Se emplearon ratones *Mus musculus* C57BL/6, una cepa de ratón muy utilizada en investigación. En este caso, todos los animales fueron del mismo sexo (hembras) que compartieron jaula entre los miembros del mismo grupo siguiendo la normativa de espacio mínimo por animal. Se determinaron varias poblaciones microbianas de la flora intestinal de los animales durante y tras la ingesta de estos antimicrobianos.

Previamente al inicio del estudio, fue solicitada autorización al Comité de Bioética de la Consellería do Medio Rural e do Mar, la cual fue concedida (ensayo autorizado nº **MR110250**), al comprobar que el protocolo presentado cumple todos los requisitos incluidos en el Real Decreto 53/2013. El procedimiento a realizar no implicó dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero alguno para los animales, tal y como establece el Real Decreto 53/2013. No obstante, dicho Real Decreto también establece que el número de animales de experimentación utilizados se debe reducir al mínimo y se evite la duplicación inútil de procedimientos. Así, utilizamos un total de 15 animales (suministrados por el animalario central de la USC) por grupo (grupos tratados y grupo control), con un total de 4 grupos. Los 15 animales pertenecientes al grupo control fueron los mismos para todos los procedimientos. Este número de animales utilizados nos da una seguridad superior al 95%, asumiendo una formulación bilateral y estimando entre un 10-20% de pérdidas de información.

### **3.4.2. Preparación de antibióticos**

Los antibióticos empleados fueron tetraciclina, sulfadiacina y ampicilina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y las concentraciones empleadas 100, 100 y 50µg/kg de alimento consumido respectivamente para los cuales existe legislación, y teniendo en cuenta la ingesta semanal recomendada de los alimentos y haciendo la media

de la ingesta diaria. Los antimicrobianos fueron preparados en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, y fueron administrados a los animales por vía oral a través de la alimentación, mediante el pienso que consumían. Al grupo tratado se les suministró una cantidad de 4 g/ratón y día de pienso al cual se les adicionó la dosis de antibiótico calculada según el peso medio del animal y correspondiente con el límite máximo de residuos, mientras que al grupo control se les administró el mismo pienso pero sin adición de antibiótico. La adición del antibiótico al pienso se hizo mediante impregnación de la disolución realizada y secado en estufa (40 °C) antes de su consumo (**Figura 16**).



**Figura 16. Diseño experimental del ensayo realizado**

### 3.4.3. Recogida y tratamiento de las muestras de heces

Las heces fueron recogidas de manera aséptica por personal del animalario una vez por semana y transportadas al laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos en una nevera portátil, que

fueron procesadas inmediatamente tras su llegada. Se recogieron muestras de heces de cada uno de los grupos de ratones en un contenedor estéril (entre 10 y 30 g por grupo) y se procesaron antes de dos horas desde su recolección. El tratamiento de preparación para la posterior extracción de ADN y cuantificación bacteriana consistió en una dilución 1:10 en PBS (ajustado a un pH 7,2-7,4) y homogeneizadas en una bolsa estéril con un Masticator<sup>®</sup> (AES, Counbourg, Francia) durante 5 min. Las muestras así homogeneizadas se transvasaron a tubos de ensayo estériles tapados y se mantuvieron en congelación hasta su uso. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN y cuantificación bacteriana siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.4.

### ***3.5. ESTUDIO DE LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE UVA DE VINO BLANCO Y UVA DE VINO TINTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA***

#### **3.5.1. Sustratos empleados**

Los sustratos utilizados para evaluar el potencial prebiótico fueron extractos secos procedentes de uva tinta (ESUT) y blanca (ESUB), concentrados proporcionados por la industria (Abrobiotec S. L, Valladolid, España). Estos extractos son obtenidos durante el proceso de elaboración del vino, siendo un residuo del mismo. Así están formados fundamentalmente por los hollejos y piel de la uva que es donde se concentran principalmente los componentes polifenólicos, siendo sus principales componentes quercetina, antocianos, antocianósidos, antocianidinas, catequinas y proantocianidinas.

### 3.5.2. Microorganismos y medios de cultivo empleados

Para llevar a cabo el estudio de fermentabilidad con cultivos puros de microorganismos considerados beneficiosos y constituyentes de la flora intestinal, se utilizaron diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, obtenidos de diferentes colecciones de cultivos tipo. Así, en la **Tabla 11** se exponen tanto las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* utilizadas, como la colección o casa comercial donde se adquirieron así como las condiciones óptimas de crecimiento proporcionadas por el fabricante.



Tabla 11. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio, las fuentes correspondientes y el origen.

Cepas probióticas	Fuente	Origen	Condiciones de incubación
<i>Lactobacillus salivarius</i> 20555	DSMZ (Braunschweig, Alemania)	Saliva humana	Caldo MRS 37°C, 24 h Aerobio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 20021		Productos lácteos, aguas residuales humanas y clínicas	
<i>Lactobacillus reuteri</i> 20016		Intestino humano (adulto)	
<i>Lactobacillus brevis</i> D-24	ESB-UCP, Portugal	Aislado del caqui	
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAFTI®L26	DSM (Moorebank, NSW, Australia)	Productos lácteos	Caldo MRS 37°C, 24 h Aerobio facultativo
<i>Lactobacillus casei</i> 431	Christian Hansen(Hørsholm, Dinamarca)	Heces infantiles	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	PROBI AB (Lund, Suecia)	Intestino humano (adulto)	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTIL10	DSM (Moorebank, NSW, Australia)	Productos lácteos	Caldo MRS + 0.05 % Cisteína 37°C, 48 h Anaerobio
<i>Bifidobacterium longum</i> 4503	CECT (Valencia, España)	Intestino adulto	
<i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i> 4553	CECT (Valencia, España)	Intestino infantil	
<i>Bifidobacterium breve</i> 4839	CECT (Valencia, España)	Intestino infantil	Caldo MRS + 0.05 % Cisteína 37°C, 24 h Anaerobio

<i>Bifidobacterium bifidum</i> 870	CECT (Valencia, España)	Heces infantiles	Caldo MRS 37°C, 48 h Anaerobio
<i>Bacteroides vulgatus</i> 17767	LMG (Ghent, Bélgica)	Heces humanas	NB + Sangre de cordero 37°C, 24 h Anaerobio
<i>Clostridium perfringens</i> 376	CECT (Valencia, España)	Bovino	RCM, 37°C, 48 h Anaerobio
<i>Enterobacter cloacae</i> 194	CECT (Valencia, España)	Fluido espinal humano	NB, 30°C, 24h, Aerobio

\*DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; \*CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; \*LMG: Bacterial collection/BCCM: Laboratory of Microorganism of Ghent University /Belgium Coordinated.



Las cepas utilizadas para la cuantificación de las diferentes poblaciones bacterianas por RT-qPCR en los ensayos de fermentación *in vitro* con inóculos fecales fueron las siguientes: *Bifidobacterium longum* CECT 4503, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Bacteroides vulgatus* LMG 17767 y *Clostridium perfringens* CECT 376.

Todos los cultivos se mantuvieron a -20°C en su medio correspondiente (Cultimed, Barcelona, España) suplementados con glicerol (30%, v/v) y se subcultivaron en el mismo medio antes de su utilización bajo las condiciones proporcionadas por el fabricante (**Tabla 11**).

### 3.5.3. Comprobación de la capacidad de fermentación de probióticos empleados

Previamente a las pruebas de fermentación colónica, se realizaron estudios para determinar si existe fermentación de los extractos polifenólicos como única fuente hidrocarbonada por parte de las cepas probióticas empleadas. Con este fin, las cepas bacterianas previamente preinoculadas (1% v/v) se cultivaron durante toda la noche en medio MRS. Dichos cultivos se diluyeron 100 veces en caldo MRS de fermentación sin glucosa, donde previamente se diluyeron los substratos polifenólicos estudiados al 2% (p/v). En el caso de las *Bifidobacterium* el medio de cultivo se suplementó también con cisteína al 0,05% (p/v). Las cepas fueron cultivadas al binomio tiempo/temperatura indicado por el fabricante (37 °C durante 24 h en el caso de *Lactobacillus* y 48 h en el caso de *Bifidobacterium*). Como control positivo se cultivaron las cepas en MRS con glucosa, y como control negativo las cepas se cultivaron en medio MRS sin glucosa. Pasado el tiempo correspondiente de incubación, el crecimiento bacteriano se evaluó mediante recuento en placa en medio MRS enriquecido en cisteína bajo las condiciones óptimas de crecimiento (**Tabla 11**) tras la realización correspondiente de las diluciones en agua peptonada.

### 3.5.4. Procedimiento *in vitro* de fermentación colónica

Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo utilizando muestras fecales de 3 voluntarios, adultos sanos (dos hombres y una mujer, de entre 25 y 35 años), que no habían tomado antibióticos durante al menos los seis meses anteriores, ni ningún suplemento que contuviese pro- y/o prebióticos y que no padeciesen ningún desorden de tipo gastrointestinal. Para este fin se empleó la metodología descrita previamente por Cardelle-Cobas y col. (2012), según la cual se empleó un medio de cultivo (250 mL por determinación) compuesto por 2 g/L agua de peptona (Merck); 2/gL de extracto de levadura (Panreac, Barcelona, España); 0,01 g/L NaCl (Panreac); 0,04 g/L  $K_2HPO_4$ ; 0,01 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Sigma-Aldrich, Steiheim, Alemania); 0,01 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 2 g/L  $NaHCO_3$  (Sigma-Aldrich); 2 mL/L Tween 80 (Panreac); 5 mg/L Hemina (Sigma-Aldrich); 10 mL/L vitamina  $K_1$  (Sigma-Aldrich); 0,5 g/L-Cisteína-HCl 0.5 g/L (Sigma-Aldrich); 0,05 g/L sales biliares (Sigma-Aldrich); 1 mg/L Resazurina (Sigma-Aldrich).

Dicho medio se inoculó con 2,5 mL de un homogeneizado de heces (1% p/v) diluido con PBS (1:10). Posteriormente, se le añadió al medio ya inoculado 2,5 g de cada uno de los extractos (ESUT y ESUB), para alcanzar una concentración final del 2% (p/v), que es el porcentaje en el que los ingredientes prebióticos suelen encontrarse en los suplementos o matrices alimentarias.

Las condiciones de ensayo fueron las correspondientes a las del colon distal. Así, las condiciones anaeróbicas se consiguieron gracias a un suministro continuo de nitrógeno libre de oxígeno. La temperatura se mantuvo a un valor constante de 37 °C mediante un suministro de agua mediante un baño termostatzado (Pharmacia Biotech, Holanda) a las camisas de los vasos de ensayo y, a un pH de 6,5, controlado mediante un dispositivo controlador de pH. Durante dicho proceso fueron realizadas diferentes tomas de muestra a 0, 5, 8, 24 y 48 h, cogiendo 1 mL para realizar las determinaciones por RT-qPCR. En la



**Figura 15** se muestra una imagen de los fermentadores utilizados para simular las condiciones descritas en el colon distal.

Todas las determinaciones posteriores siguieron el procedimiento de RT-qPCR descrito en el apartado 3.1.4., empleando las sondas descritas correspondientes a la microbiota total, y a los géneros *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bacteroides* spp.

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación estadística de los resultados obtenidos se empleó el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) para Windows versión 20.0. En todos los casos analizados, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el grado de significación ( $P$ ) < 0,05. En todos los casos, los recuentos de las diferentes poblaciones bacterianas, fueron expresados como log ufc/g heces  $\pm$  desviación estándar.

En el caso de la comparación entre los diferentes grupos bacterianos estudiados en la caracterización de la MI de la población gallega, los grupos bacterianos fueron comparados entre diferentes grupos de sujetos en función de su adherencia a la DASE, edad e IMC. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA).

En el caso de la comparación de los resultados obtenidos en los estudios de inhibición de los antibióticos *in vitro* sobre cultivos puros, sobre cultivos mixtos, e *in vivo* en animales de experimentación, los resultados obtenidos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA).

En el caso del estudio de los efectos de los extractos ESUT y ESUB sobre la microbiota intestinal *in vitro* de sujetos voluntarios, la comparación se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y el test DMS.





## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ***4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN Y ESTILO DE VIDA EN LA MICROBIOTA INTESTINAL EN PERSONAS DE LA POBLACIÓN GALLEGA***

#### **4.1.1. Caracterización de la población en estudio**

Como se ha descrito en la metodología empleada, en primer lugar se hizo una caracterización antropométrica y estilo de vida de los 31 sujetos que participaron en el estudio y los resultados se pueden encontrar en la **Tabla 12**.

**Tabla 12. Caracterización antropométrica y de estilo de vida de la población a estudiar (media  $\pm$  desviación estándar)**

Parámetros	Valores
Edad (años)	28,3 $\pm$ 9,73
Peso (Kg)	68,39 $\pm$ 13,25
Altura (cm)	168 $\pm$ 8,91
IMC	23,33 $\pm$ 1,74

Sexo (mujer/hombre)	22/9
Fumadores (%)	12,9
Alergias alimentarias o intolerancia (%)	Total 25,8; Lactosa (12,9); Gluten (6,4); <i>Anisakis</i> (3,2); Trehalosa (3,2)
Horas de sueño	7,12 ± 0.98
Hora de acostarse	00:45 ± 1,14
Ejercicio físico (horas a la semana)	2,71 ± 1,76

En la **Tabla 12** se puede observar, en términos globales que se trata de una población entre joven y de mediana edad, con un promedio de  $28,3 \pm 9,73$  años. En relación al promedio de peso y altura, éstos se sitúan en un peso corporal medio de  $68,39 \pm 13,25$  kg y una altura media de  $168 \pm 8,91$  cm, lo que conduce a un IMC de  $23 \pm 1,74$ . Este dato caracteriza a la población de estudio con un IMC promedio en normopeso, si bien 11 de los sujetos (35,48%) se encuentran en estado de sobrepeso u obesidad ( $IMC > 25$ ). Este resultado es consistente con los datos publicados recientemente, en los que se encontró una tasa de obesidad de alrededor del 25% en la población adulta gallega (Aranceta-Bartrina y col., 2016).

El número de alergias e intolerancias que presentaban los sujetos incluidos en el estudio alcanzó una tasa total del 25,8% encontrándose en un nivel alto. De entre las intolerancias que presentaban los sujetos, la más común fue la intolerancia a la lactosa (12,9%), lo cual es inferior a los últimos datos de incidencia encontrados en el conjunto de España (alrededor del 30%) (Argüelles-Arias y col., 2014).

Por otra parte, la población estudiada presentó bajos índices de tabaquismo (12,9%), cuando actualmente en la sociedad española hay cerca del 30% de fumadores (Gutiérrez-Abejón y col., 2015). El número de horas de sueño se encontró por debajo de lo recomendado para las personas de mediana edad (8 horas al día) en casi una hora de sueño y

día. Además, los participantes declararon irse por término medio a la cama después de la medianoche. Si tenemos en cuenta que generalmente las jornadas laborales o estudiantiles de los sujetos comenzaban a las 9:00 de la mañana, el hecho de que la población diana se acueste tan tarde es un inconveniente para el mantenimiento a largo plazo de un correcto peso corporal. Esto se debe a que según recientes investigaciones, a partir de las 20:00 horas la secreción de grelina (hormona obesogénica), se incrementa, manteniéndose elevada hasta que el sujeto se acueste (Garaulet y Gómez-Abellán, 2013).

Con respecto al ejercicio físico, los sujetos informaron un promedio de 2,71 horas a la semana, lo que se traduce en un promedio de 23,23 minutos de ejercicio al día, siendo este dato promedio diario inferior al recomendado por la (SENC, 2011) para la población española. Según el consenso publicado por esta sociedad, son necesarios un mínimo de 30 minutos de ejercicio diario para la prevención del aumento de peso que ocurre con la disminución del metabolismo basal como consecuencia del envejecimiento.

#### **4.1.2. Valoración de la ingesta dietética y grado de adhesión a la DASE**

Para la valoración de la ingesta dietética, se utilizó un cuestionario de frecuencia de alimentos para conocer la ingesta diaria de macro y micronutrientes. Los resultados se pueden encontrar en la **Tabla 13**.

**Tabla 13. Ingesta diaria media (g) de consumo de diferentes grupos de alimentos y nutrientes de los participantes**

<b>Grupos de alimentos</b>	<b>Cantidad diaria</b>
Bebidas sin alcohol	909,33 ± 268,84
Frutas	454,01 ± 157,97
Leche y productos lácteos	348,89 ± 161,32
Vegetales	329,50 ± 185,36

Cereales	219,16 ± 101,59
Carne y productos cárnicos	136,12 ± 104,98
Bebidas alcohólicas	84,21 ± 86,32
Pescado y productos pesqueros	82,13 ± 13,56
Legumbres	63,61 ± 48,50
Aceites y grasas	39,15 ± 30,14
Alimentos de panadería	39,39 ± 43,80
Alimentos precocidos y bocadillos	20,19 ± 16,22
Huevos	18,93 ± 9,23

### Nutrientes

Energía (Kcal/d)	2756,22 ± 413,56
Proteína total (g/d)	82,57 ± 12,14
Proteína animal	53,1 ± 11,34
Proteína vegetal	29,5 ± 17,13
Grasas totales (g/d)	72,14 ± 21,78
Ácidos grasos saturados	17,0 ± 4,12
Ácidos grasos monoinsaturados	27,2 ± 18,32
Ácidos grasos poliinsaturados	10,8 ± 3,42
Carbohidratos totales (g/d)	431,05 ± 64,28
Azúcares (g/d)	286,0 ± 42,28
Polisacáridos	145,0 ± 28,18
Fibra (g/d)	27,31 ± 7,13
Etanol (g/d)	6,8 ± 2,13
Sodio (mg/d)	3520,3 ± 1523,74

Como se puede observar, el consumo de bebidas (teniendo en cuenta que la encuesta separa las bebidas alcohólicas y las no alcohólicas) arroja unos datos inferiores a un litro/persona y día. Con respecto a los alimentos sólidos, el consumo de frutas (454,01 g/día), leche y productos lácteos (348,89 g/día) y hortalizas (329,50 g/día) son los más consumidos, respectivamente. El consumo de cereales (219,16 g/día), que tradicionalmente ocupa el primer lugar entre los diferentes grupos de alimentos consumidos a nivel nacional, en la población estudiada se mantuvo en el cuarto puesto. En el resto de los grupos de alimentos, destaca una ratio carne/pescado de 1,66 y un consumo muy bajo tanto de alimentos precocinados y aperitivos (20,19 g/día) como de huevos (19,93 g/día).



Si comparamos estos promedios de consumo con los publicados anualmente por el Panel de Consumidores del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2015), los datos obtenidos no siguen una tendencia similar con el nivel promedio nacional. En primer lugar, el consumo de bebidas (considerando que la encuesta incluye tanto bebidas alcohólicas como no alcohólicas), produce datos inferiores a un litro / persona y día, lo que sugiere que los sujetos han omitido o subestimado la ingesta de algunas bebidas. En el resto de los componentes, se observó una desviación suficiente para sugerir la presencia de un patrón alimentario diferente al actual a nivel nacional. Así, las diferencias más importantes con respecto al consumo de alimentos en España, fueron el mayor consumo de frutas (454,01 g/día vs 271,5 g/día, respectivamente), hortalizas (329,5 g/día vs 260,9 g/día), leguminosas (63,61 g/ día vs 8,39 g/día) y pescado (82,13 g/día vs 70,96 g/día). Por el contrario, se encontró un menor consumo de productos de panadería (39,39 g/día vs 96,3 g/día) y alimentos precocinados y aperitivos (20,19 g/día vs 73,32 g/día) que los publicados a nivel español (Guallar-Castillón y col., 2014; MAPAMA, 2015). Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la ingesta media de estos sujetos representa un contenido energético de 2.756,22 Kcal, en la que la mayoría sería un 63,8% de carbohidratos, 24% de grasas y 12,2% de proteínas. Esta distribución es baja en grasas y alta en carbohidratos con respecto a los objetivos establecidos por SENC para los españoles. Este patrón se relaciona con la influencia de un perfil dietético de la DASE.

Los resultados de adherencia a la DASE (**Tabla 14**) muestran que 7 sujetos (22,6%) presentan una alta adherencia, mientras que la mayoría de los 21 participantes (67,4%) mostraron adherencia intermedia y solo 3 (9,7%) mostraron baja adherencia. Además, según el programa de cálculo dietético utilizado (EasyDiet®) los sujetos necesitan una dieta promedio de 2.767 Kcal/día debido a su edad, condiciones antropométricas y actividad física. Por lo tanto, la ingesta calórica de los sujetos es en términos globales adecuados y no justifica los altos niveles de sobrepeso y la obesidad en esta región geográfica (Aranceta-Bartrina y col., 2016, Pérez-Farinós y col., 2013).

**Tabla 14. Número y porcentaje de adhesión de los sujetos participantes a la Dieta Atlántica del Sur de Europa**

Tipo Adhesión	Nº sujetos	Porcentaje sobre total
Alta	3	9,7
Media	21	67,4
Baja	7	22,6

#### **4.1.3. Valoración de la composición de la microbiota intestinal de los sujetos participantes**

Según podemos observar en la **Tabla 15**, se cuantifican los resultados obtenidos para los principales filos y géneros de especial relevancia dentro de la microbiota intestinal de estos sujetos.

**Tabla 15. Resultados obtenidos en el estudio de evolución de la microbiota colónica humana**

Grupo bacteriano	Cuantificación*
Microbiota total	13,72 ± 0,7
Firmicutes	12,76 ± 0,79
Bacteroidetes	11,74 ± 1,11
Proteobacteria	7,02 ± 0,25
Actinobacteria	12,28 ± 1,05
<i>Bacteroides</i> spp.	10,37 ± 2,20
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,26 ± 1,29
<i>Lactobacillus</i> spp.	9,10 ± 1,22

\*Los resultados se expresan sobre log ufc/g ± desviación estándar.

Como se puede observar en la **Tabla 15**, con respecto al recuento de la microbiota total y la composición bacteriana, entre los participantes, los resultados obtenidos muestran un alta de cantidad  $\log_{10}$  ufc/g, que oscila entre 12-13 (teniendo siempre en cuenta que se trata de una extrapolación a partir de copias de ADN, que no se corresponde de manera directa y exacta con las ufc/g) (Guarddon y col., 2011). Trabajos recientes realizados por otros autores han publicado recuentos totales de MI en la porción distal del colon del orden de 11  $\log$  ufc/g (Abdou y col., 2016; Arumugam y col., 2011, Power y col., 2014). El hecho de que en nuestro trabajo los recuentos totales de MI sean más altos puede deberse a una distribución de edad diferente a los sujetos estudiados por estos autores, ya que es un hecho conocido que el MI varía en cantidad y composición a lo largo del ciclo de vida (Roca-Saavedra y col., 2017b). Los altos recuentos totales encontrados también pueden deberse a las particularidades de la dieta ingerida por los sujetos estudiados, ya que una infinidad de factores dietéticos influyen en la composición y cantidad de la microbiota del colon (Power y col., 2014). En cualquier caso, a pesar de que actualmente no hay un consenso sobre la composición de una MI "ideal", si se acepta que las cantidades más elevadas, con una mayor variedad son indicativos de una buena salud intestinal (Arumugam y col., 2011).

Con respecto a la composición de los filos principales de la MI, se encontró que los Firmicutes, son el filo más abundante de la MI de estos sujetos. El hecho de que este filo esté abundantemente representado en los sujetos estudiados coincide con el hecho de que dicho filo suele ser el predominante en los individuos que consumen un tipo de dieta occidental, con alto contenido en alimentos ricos en grasas de origen animal (Le Chatellier y col., 2013; Power y col., 2014). Con respecto al filo Bacteroidetes, sus recuentos fueron inferiores a Firmicutes. Este resultado coincide con trabajos previos, que han publicado que los Bacteroidetes se encuentran generalmente en cantidades más bajas que los Firmicutes, si bien ambos grupos representan casi el 90% de la MI (Le Chatellier y col., 2013, Singh y col., 2016).

Con respecto a los otros filos investigados (Actinobacteria y Proteobacteria), los resultados mostraron recuentos mayores de Actinobacteria que de Proteobacteria, y fueron significativamente mayores que los encontrados hasta ahora por otros autores (Arumugam y col., 2011, Koeth y col., 2013). La alta presencia de Actinobacteria podría estar relacionada con el alto nivel de obesidad en la población gallega, ya que algunas publicaciones demostraron previamente que este filo es especialmente abundante en personas obesas (Arumugam y col., 2011). Por otra parte, el bajo nivel de Proteobacteria encontrado es un hallazgo muy positivo, ya que este filo incluye la mayoría de las bacterias patógenas conocidas del tracto digestivo humano (Jones y col., 2014; Koeth y col., 2013). Por lo tanto, una baja presencia de este filo denota bajo riesgo de enfermedades gastrointestinales infecciosas.

Además, dos géneros con una función relevante para la salud humana como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. se encontraron en elevadas cantidades (8-9 log<sub>10</sub> ufc/g). Ambos géneros, son importantes para varias funciones fisiológicas, como es el desarrollo de la respuesta inmune (Cresci y Bawden, 2016), hasta tal punto que algunas especies pertenecientes a estos géneros se consideran probióticos (Conlon y Bird, 2015).

#### **4.1.4. Composición de la microbiota intestinal en sujetos con diferentes IMC**

Con respecto a la relación de la composición de la MI (teniendo en cuenta los filos y géneros principales a estudio) y el IMC de los sujetos participantes, los resultados obtenidos se pueden ver en la **Tabla 16**.

**Tabla 16. Grupos bacterianos cuantificados en muestras fecales humanas en sujetos con diferentes índices de masa corporal (IMC)**

Grupo bacteriano	IMC <20 (n=5)	IMC 20-25 (n=15)	IMC >25 (n=11)
Microbiota total	13,05 ± 0,13	12,56 ± 1,40	12,71 ± 0,42
Firmicutes	12,24 ± 0,27	11,94 ± 0,51	11,68 ± 0,46
Bacteroidetes	9,71 ± 0,49 <sup>b</sup>	10,06 ± 0,53 <sup>a,b</sup>	10,34 ± 0,72 <sup>a</sup>
Actinobacteria	9,34 ± 0,27 <sup>b</sup>	9,82 ± 0,93 <sup>b</sup>	11,12 ± 0,32 <sup>a</sup>
Proteobacteria	6,46 ± 0,25	6,18 ± 0,46	5,95 ± 0,43
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,35 ± 0,19 <sup>a</sup>	9,33 ± 0,93 <sup>b</sup>	8,67 ± 0,71 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,03 ± 0,02	8,15 ± 1,13	7,96 ± 1,67

\*Los resultados se expresan como  $\log_{10}$  ufc/g ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>Los resultados con letras diferentes en la misma fila muestran resultados significativamente diferentes.

En términos globales, no se encontraron diferencias significativas entre la mayor parte de los grupos bacterianos investigados en función del IMC de los sujetos. Sin embargo, se encontró que el filo de los Bacteroidetes era significativamente más alto en sujetos con sobrepeso que en sujetos con bajo peso. Este resultado está en línea con lo previamente publicado por algunos autores hasta la fecha (Le Chatellier y col., 2013).

Por otra parte, el filo Actinobacteria se encontró en mayores cantidades en los sujetos con sobrepeso que en los sujetos con peso inferior y normal. Del mismo modo, los resultados obtenidos también fueron mayores a los publicados previamente por otros autores (Arumugam y col., 2011, Gupta y col., 2016).

Con respecto a los dos géneros estudiados, se observa que *Bifidobacterium* spp., un género tradicionalmente relacionado con el concepto de “microbiota saludable” (Arbolea y col., 2014), presenta cantidades significativamente mayores en los sujetos con bajo peso corporal, y su presencia va disminuyendo gradualmente a medida que aumenta el IMC. En cambio, no se encontró diferencia alguna en el caso de *Lactobacillus* spp.

#### 4.1.5. Composición de microbiota intestinal en sujetos con diferente adherencia a la Dieta Atlántica del Sur de Europa

Como puede verse en la **Tabla 17**, no hay diferencias importantes en la MI de sujetos con diferente adherencia a la DASE. Se observa una ligera reducción en el número de Firmicutes y un ligero aumento en la presencia de Proteobacteria, aunque estos cambios no alcanzan niveles estadísticamente significativos. El único grupo bacteriano que si alcanza diferencias estadísticamente significativas es el género *Bifidobacterium* spp. que está en mayor cantidad en los sujetos con mayor adhesión a la DASE.

Tabla 17. Grupos bacterianos cuantificados en muestras de heces humanas en sujetos con menor, intermedia y alta adherencia a la Dieta Atlántica del Sur de Europa.

Grupo bacteriano	Baja adherencia (n=3)	Adherencia intermedia (n=21)	Alta adherencia (n=7)
Total microbiota	13,11 ± 0,38	12,44 ± 1,30	12,89 ± 0,10
Firmicutes	12,36 ± 0,38	11,80 ± 0,49	11,85 ± 0,29
Bacteroidetes	10,17 ± 0,68	10,85 ± 0,74	10,20 ± 0,22

Actinobacteria	11,09 ± 0,95	10,93 ± 1,13	11,56 ± 0,62
Proteobacteria	6,18 ± 0,14	6,22 ± 0,56	6,32 ± 0,53
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,92 ± 0,92 <sup>b</sup>	9,29 ± 1,10 <sup>a,b</sup>	9,92 ± 0,43 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,43 ± 1,10	8,17 ± 1,26	8,37 ± 0,44

\* Los resultados se expresan como log<sub>10</sub> ufc/g ± desviación estándar. <sup>a-b</sup> Valores en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes.

Como ya se ha mencionado, el género *Bifidobacterium* spp. se relaciona con el concepto de MI saludable (Arbolea y col., 2014), además de estar estrechamente relacionado con el consumo de lácteos, uno de los diez puntos recogidos en el decálogo de la DA.

#### 4.1.6. Composición de la microbiota intestinal en sujetos de diferente edad

Las diferentes cantidades de los grupos bacterianos investigados en sujetos con diferentes edades se pueden ver en la **Tabla 18**.

**Tabla 18. Cuantificación de grupos bacterianos en muestras de heces en sujetos con diferentes edades**

Edad objetivo	<20 años (n=5)	20-30 años (n=15)	>30 años (n=11)
Total microbiota	12,83 ± 1,72	12,57 ± 1,46	12,66 ± 0,59
Firmicutes	11,88 ± 0,63	11,97 ± 0,65	11,73 ± 0,65

Bacteroidetes	9,87 ± 0,80	9,89 ± 0,57	10,12 ± 1,03
Actinobacteria	11,70 ± 1,71	11,60 ± 0,76	10,12 ± 0,25
Proteobacteria	5,29 ± 0,29 <sup>b</sup>	6,54 ± 0,67 <sup>a</sup>	6,68 ± 0,52 <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9,74 ± 1,11	9,08 ± 1,52	9,37 ± 0,55
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,30 ± 0,68 <sup>a,b</sup>	7,82 ± 1,22 <sup>b</sup>	9,44 ± 0,24 <sup>a</sup>

\* Los resultados se expresan como log<sub>10</sub> ufc/g ± desviación estándar. <sup>a-b</sup> Valores en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes

Uno de los factores que pueden afectar de manera importante a la composición de la MI es la edad de los sujetos (Gupta y col., 2016; Jones y col., 2014; Tan y O'Toole, 2015). En el presente trabajo, no se encontraron grandes diferencias dependiendo de los diferentes grupos de edad, excepto en algunos casos específicos, como es el caso del filo Proteobacteria, que mostró cantidades significativamente mayores en el grupo de edad > 40 años que en el grupo de edad <20 años. Este resultado es coherente si se considera que las proteobacterias contienen mayor cantidad de genes codificantes a resistencias a antibióticos que los restantes grupos de la MI (Panda y col., 2014). Lógicamente, cuanto mayor es el individuo, mayor es la probabilidad de que haya sido sometido a tratamientos antibióticos que influyen en su MI y microbioma. También es importante señalar que este grupo incluye a la familia Enterobacteriaceae, de la que su vez forman parte la mayoría de los patógenos de origen intestinal para los seres humanos. De hecho, una mayor presencia de esta familia suele considerarse un marcador indirecto de una elevada ingesta de alimentos de origen animal (Conlon y Bird, 2015; Cresci y Bawden, 2016; Le Chatellier y col., 2013).

Por otra parte, es también notable que el contenido en *Lactobacillus* spp. fue significativamente mayor en los sujetos de mayor edad que en el grupo de edad intermedia, mientras que no hay diferencias en relación con los grupos de edad más jóvenes. Teniendo en cuenta que



no presenta una evolución lógica a lo largo del ciclo vital, (primero aumenta y luego disminuye), es razonable pensar que su presencia depende del consumo de alimentos que incluyen *Lactobacillus* spp. de modo natural (Cresci y Bawden, 2016; Jones y col., 2014).

### **4.2. CONSUMO DE ÁCIDO FITÁNICO Y SALUD HUMANA: RIESGOS, BENEFICIOS Y TENDENCIAS FUTURAS**

#### **4.2.1. Fuentes alimentarias de ácido fitánico**

Dado que los humanos no pueden convertir de manera endógena el fitol libre en AF, no acumulan cantidades significativas de AF como consecuencia del consumo de alimentos vegetales. Por consiguiente, la presencia de AF en el cuerpo humano es de origen exclusivamente exógeno y se ingiere en la dieta como AF preformado, principalmente derivado de carne de rumiantes, de productos de la pesca y de productos lácteos (Wanders y col., 2011). Como se indica en la **Tabla 19**, distintos alimentos pueden aportar AF a los humanos, aunque los alimentos mencionados anteriormente son las fuentes principales. Sin embargo, en la actualidad existe un gran desconocimiento acerca de su contenido en los alimentos, dado que los valores de AF no se incluyen actualmente en ninguna base de datos de composición de alimentos y hay muy poca bibliografía científica al respecto.

Una dieta habitual humana contiene entre 50 y 100 mg de AF por día, dependiendo del tipo de alimentos ingeridos (Allen y col., 2008; Vetter y Schröder, 2011). Como consecuencia, el nivel de AF en el plasma sanguíneo varía en función de su contenido en la dieta y oscila entre 0,486 y 5,77  $\mu\text{M}$ , siendo en los consumidores habituales de carne roja entre 6-7 veces mayor que en los veganos (Allen y col., 2008). Del mismo modo, el plasma sanguíneo de los vegetarianos (no veganos) presenta un contenido de AF 4-5 mayor que el de los veganos. Por dicho

motivo, se ha propuesto que la concentración plasmática de AF fuese un indicador de la ingesta de grasas animales (Allen y col., 2008).

Entre los alimentos de origen terrestre, la principal fuente de AF en la dieta humana son los alimentos producidos por los rumiantes (Werner y col., 2011). El AF se acumula en el tejido adiposo y en la leche de los rumiantes y se obtiene fundamentalmente en la dieta humana por medio de su consumo. Tanto en la leche como en la carne roja su contenido en AF varía de un modo importante y depende exclusivamente de la alimentación de los animales, especialmente de la cantidad de pastos verdes que ingieran (Werner y col., 2011). La leche y los productos lácteos suelen contener aproximadamente 100-500 mg de AF/ 100 g de grasa. Por otro lado, la leche semidesnatada contiene aproximadamente la mitad del valor de AF de la leche entera y los productos de leche fermentada contienen un valor equivalente al del yogur bajo en grasa (un 2,5% de grasa). El principal contribuyente de esta categoría es el kéfir (también un 2,5% de grasa) (Wright y col., 2012).

En lo que se refiere a las carnes, la ternera (50-300 mg AF/100 g de grasa) posee más contenido de AF que la carne de otras especies de rumiantes habitualmente consumidas y mucha más que la de otros tipos de carne habituales en nuestra alimentación, como es el caso del cerdo (4 mg AF/100 g de grasa) (Vetter y Schröder, 2010).

Con respecto a los alimentos marinos, ciertas especies de pescado graso, como el salmón (*Salmo salar*), el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) y el capelán (*Mallotus villosus*) también acumulan cantidades apreciables de AF, superiores a 100 mg / 100 g de alimento (Brown y col., 1993; Hellgren, 2010). El mecanismo exacto de cómo esto ocurre no está claro, pero puede deberse a la ingesta de fitoplancton o especies relacionadas que acumulan clorofila o sus productos de degradación (Verhoeven y Jacobs, 2001). Además, otras importantes fuentes potenciales de AF son los suplementos alimenticios obtenidos a partir de aceite marino, que pueden contener aproximadamente 640-750 mg AF / 100 g (Hellgren, 2010). Recientemente, se encontró que

productos elaborados a partir de cangrejo contienen 12-19 mg de AF / 100 g de alimento (Yun y Yan, 2015). Esto indica que las dietas tradicionales basadas en el mar, como la Dieta Ártica (DAr), típica de Groenlandia, contienen niveles mucho más altos de AF que otras dietas occidentales (Hellgren, 2010). Además, la DASE incluye un alto consumo de alimentos ricos en AF, debido a que por su situación en la zona de la costa atlántica, la pesca siempre ha sido una actividad muy importante en la industria local. Además, debido a la alta pluviosidad en la región, abundan los pastos verdes, lo que favorece la ganadería extensiva. Como resultado, la carne roja y los productos lácteos son también alimentos básicos en la DASE (Guallar-Castillón, y col., 2013; Oliveira y col., 2010). Por lo tanto, una de las principales diferencias entre la DASE y otras dietas occidentales es que la DASE incluye un alto consumo de carne roja, productos lácteos y pescado (Guallar-Castillón y col., 2013). Sin embargo, la presencia en los alimentos y la actividad del AF sobre la salud de consumidores en esta región geográfica ha sido muy poco investigada por no decir que es prácticamente desconocida.

**Tabla 19. Contenido de ácido fitánico en alimentos de consumo habitual en la dieta occidental**

Alimento	Contenido de ácido fitánico (mg/100 g de alimentos)	Referencia
<b><u>Leche y productos lácteos</u></b>		
Leche entera	9,7	Brown y col. 1993
Leche baja en grasa	4,9	Wright y col. 2012
Leche evaporada	24,4	Brown y col. 1993
Mantequilla	176,7	Brown y col. 1993

Quesos grasos curados	98,9	Brown y col. 1993
Queso procesado	65,6	Brown y col. 1993
Productos a base de crema	11,0	Wright y col. 2012
Yogur	2,1	Brown y col. 1993
Yogur descremado	0,56	Champman, 2006
<hr/> <b><u>Carne roja</u></b>		
Carne de vaca	33,1	Brown y col. 1993
Grasa de vaca “ecológica”	325,9	Brown y col. 1993
Salchichas	5,0	Wright y col. 2012
<hr/> <b><u>Otras carnes</u></b>		
Pollo	2,6	Champman, 2006
Carne de cerdo	3,8	Champman, 2006
Conejo	2,2	Champman, 2006
Pavo	0,74	Champman, 2006
<hr/> <b><u>Pescados grasos</u></b>		
Sardinas en conserva	40,3	Brown y col. 1993
Atún enlatado	4,9	Brown y col. 1993
Capelán	1.000	Hellgren, 2010
Bacalao	5,4	Brown y col. 1993
Carne de cangrejo	12-19	Yun y Yan, 2015

Suplementos de aceite de pescado	640-750	Hellgren, 2010
Fletán	1.000	Hellgren, 2010
Arenque	3,0	Wright y col. 2012
Salmón	110,3	Brown y col. 1993
<b><u>Otros alimentos</u></b>		
Media de frutas frescas y hortalizas	0,1	Champman, 2006
Media de frutas cocidas y hortalizas	0,5	Champman, 2006
Frijoles	0,27	Champman, 2006
Zanahorias	0,25	Champman, 2006
Cereales	<0,1	Brown y col. 1993
Huevos	0,25	Champman, 2006
Margarina	76,0	Brown y col. 1993
Patata	0,25	Champman, 2006
Calabaza	0,25	Champman, 2006
Otros aceites	0,17	Champman, 2006
Arroz	0,7	Champman, 2006
Aceite de soja	0,14	Champman, 2006
Pan blanco	1,6	Champman, 2006

#### 4.2.2. Modificación del contenido en ácido fitánico durante la producción de alimentos

Un estudio reciente demostró que la concentración de AF en la grasa láctea aumentaba de 0,15% a 0,45% en vacas alimentadas solamente con pastos en comparación con la leche producida por vacas alimentadas con una mezcla de hierba seca y ensilado de maíz (Schröder y col., 2014). De hecho, debido a la mayor utilización de pastos verdes en la alimentación de animales productores de leche ecológica, el contenido de AF es superior al de la leche convencional (Che y col., 2013; Werner y col., 2011). En consecuencia, tanto el fitol como su principal producto de degradación (AF) se han propuesto como marcadores de la producción extensiva y/o ecológica (Schröder y col., 2014). Así mismo, Leiber y col. (2005) han mostrado un contenido tres veces mayor de AF en la grasa de la leche (de 150 a 450 mg/100 g) cuando las vacas pasaron de una ración a base de heno, ensilado de hierba, ensilado de maíz y concentrado, a una ración basada íntegramente de hierba fresca. Tanto es así, que en algunos países nórdicos, se ha determinado un umbral de contenido de AF en la leche para ser considerada ecológica, de al menos 200 mg / 100 g (Vetter y col., 2012). También Baars y col. (2012) han demostrado un contenido de AF del doble en la grasa de la leche producida en verano comparado con la leche producida por los mismos animales en invierno (Baars y col., 2012; Che y col., 2013a; Che y col., 2013b).

Con respecto a las carnes, el perfil de los ácidos grasos de la carne procedente de animales monogástricos refleja en gran medida la composición de la grasa incluida en la alimentación en los mismos. Por el contrario, la composición de los ácidos grasos de la carne de rumiantes solamente se ve afectada hasta cierto punto por la alimentación de los animales, ya que los ácidos grasos ingeridos son total o parcialmente hidrogenados por procesos microbianos en el rumen. Los datos publicados sobre el contenido de AF en carne también son escasos, pero los cálculos aproximados sugieren que puede variar desde 4 mg/100 g en la ternera magra hasta más de 300 mg/100 g en la grasa de ternera ecológica (Brown y col., 1993). Por consiguiente, puede concluirse que el contenido de AF de la carne de ternera está influenciado al menos por el tipo de producción (Che y col., 2013a; Che y col., 2013b).

En cuanto a los productos lácteos, su contenido en AF depende de más factores que el contenido de la leche empleada como ingrediente para su elaboración. Así, el contenido en AF de los productos lácteos como los quesos, provienen probablemente, de cambios post-ordeño, como su degradación parcial durante el almacenamiento o el impacto de los microorganismos utilizados en el procesamiento del queso. Por tanto, el contenido en AF no es un parámetro adecuado como marcador de queso ecológico. Resultados similares se ha encontrado para otros tipos de productos lácteos, como la mantequilla (Schröder y col., 2014).

No sólo el contenido en AF depende de los métodos empleados en la producción de alimentos, sino que la proporción de los diferentes diastereoisómeros (-SRR ó -RRR, según lo explicado en la introducción) también varía. En la leche de vacas alimentadas de forma ecológica la proporción del isómero -SRR ha sido de un 47%, mientras que en la convencional, la proporción del isómero -SRR ha sido de un 85% (Schröder y Vetter, 2011). También se han encontrado diferencias en la proporción de diastereoisómeros en el queso, representado el isómero -SRR entre un 39-71% en quesos ecológicos y un 51-84% en los quesos convencionales (Lucquin y col., 2016; Schröder y Vetter, 2011).

#### **4.2.3. Riesgos del consumo de ácido fitánico para la salud humana**

La ingestión y posterior acumulación del AF en personas que no pueden eliminarlo de forma correcta, se ha relacionado con efectos negativos sobre la salud humana, que se muestran en la **Tabla 20**. Los principales riesgos del consumo de AF están relacionados con el riesgo de daños neuronales (Busanello y col., 2010; Kahrlet y col., 2005; Nagai, 2015; Reiser y col., 2006; Ronicke y col., 2009; Selkälä, y col., 2015), daños vasculares (Idel y col., 2002; Mönnig y col., 2004), efectos tóxicos sobre la piel (Komen y col., 2007), estrés oxidativo y degenerativo (Leipnitz y col., 2010; Schönfeld y col., 2004), así como

el riesgo de desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Kataria y col., 2015; Ollberding col, 2013; Walsh, 2005; Wierzbicki, 2007; Wright y col., 2012; Xu y col., 2005).

**Tabla 20. Trabajos recientes sobre los efectos perjudiciales del ácido fitánico en modelos de cultivo de humanos, animales y celulares**

Referencia	Diseño del estudio	Número y tipo de muestra	Conclusión principal
Bussanello y col., 2010	<i>In vitro</i>	Ratas Wistar preparaciones cerebrales	El AF disminuye <i>in vitro</i> la actividad sináptica Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa, una enzima crucial para la neurotransmisión normal
Idel y col., 2002	<i>In vitro</i>	Células de músculo liso vasculares de ratas Wistar macho	El AF induce la apoptosis dependiente del óxido nítrico en las células del músculo liso vascular
Kahlert y col., 2005	<i>In vitro</i>	Células hipocampo del cerebro obtenidas a partir de crías de rata Wistar	El AF causó la muerte de la células gliales de los astrocitos
Kataria y col., 2015	Ensayo clínico	81 hombres sometidos a prostatectomía radical para el tratamiento de cáncer de próstata	Niveles elevados de AF son responsables de la sobre-expresión de la enzima AMACR en el cáncer de próstata



Komen y col., 2007	<i>In vitro</i>	Fibroblastos de piel humana	El AF no esterificado ejerce su efecto tóxico en fibroblastos de piel humana
Kruska y Reiser, 2011	<i>In vitro</i>	Línea celular pancreática humana CFPAC-1	La desregulación del $Ca^{2+}$ mediada por AF puede ser uno de los mecanismos de toxicidad por AF
Leipnitz y col., 2010	<i>In vivo</i>	Ratas macho Wistar	El AF provoca incremento del estrés oxidativo
Mönnig y col., 2005	<i>In vivo</i>	Ratones SCP2-nulo y C57BL / 6	La acumulación de AF en las membranas del miocardio se asocia con la muerte súbita cardíaca
Nagai, 2015	<i>In vitro</i>	Neuroblastoma de ratón Neuro2a	El AF aumenta la actividad de la Hdac y reduce la acetilación de histonas en células Neuro2a, causando daño neuronal
Ollberding y col., 2013	Ensayo clínico	336 casos y 460 controles	Alto consumo de AF puede aumentar el riesgo de LNH.
Reiser y col., 2006	<i>In vitro</i>	Células del hipocampo de crías de rata Wistar	El AF causa la muerte celular de astrocitos

Rönicke y col., 2009	<i>In vitro</i>	Células del hipocampo de crías de rata Wistar	El AF ejerce diferentes actividades tóxicas sobre las células del cerebro
Schönfeld y col., 2004	<i>In vitro</i>	Mitocondrias de cerebro y corazón de ratas adultas	El AF induce la reducción en el suministro de ATP mitocondrial e induce la aparición de procesos degenerativos.
Schönfeld y Reiser, 2006	<i>In vitro</i>	Mitocondrias de cerebro y corazón de ratas adultas	La exposición crónica al AF aumenta la generación de superóxido celular y causa daño oxidativo
Schönfeld y col., 2006	<i>In vitro</i>	Células del hipocampo de crías de rata Wistar	El AF parece iniciar la muerte celular de astrocitos
Selkälä y col., 2015	<i>In vivo</i>	Ratones C57BL/6 con déficit de AMACR	Tanto el AF como el AP a altas concentraciones causan neuropatía sensorimotora, convulsiones y encefalopatía recurrente
Xu y col., 2005	Ensayo clínico	104 pacientes diagnosticados con cáncer de próstata	Los resultados obtenidos sugieren que elevados niveles de AF pueden estar asociados con el riesgo de cáncer de próstata
Walsh, 2005	Ensayo clínico	104 pacientes con cáncer de próstata	Los niveles séricos de AF entre los pacientes de cáncer de próstata fueron significativamente mayores que la de los controles no afectados

Wright y col. 2012	Ensayo clínico	29.133 hombres de Finlandia que fumaban cinco o más cigarrillos al día	El AF consumido en productos lácteos altos en grasa se asocia con un riesgo elevado de cáncer de próstata agresivo
--------------------	----------------	--	--

AF: Ácido fitánico; ATPasa: adenosina trifosfatasa; AMACR: \ alfa - metilacil - CoA racemasa; Hdac: Histona desacetilasa; LNH: Linfoma no Hodgkin; ATP: Adenosín trifosfato; AP: Ácido pristánico

#### 4.2.4. Beneficios de la ingestión de ácido fitánico en la salud humana

Las posibles propiedades potencialmente beneficiosas de la salud humana del AF se enumeran en la **Tabla 21**. Entre estos efectos, se ha publicado que el AF muestra efectos beneficiosos en el metabolismo de la glucosa (Jay y Ren, 2007; McCarty, 2001; Schlüter y col., 2002a), la prevención del síndrome metabólico (Heim y col., 2002), la mejora del metabolismo de los lípidos (McCarty, 2001; Islam y col., 2015), la mejora del equilibrio energético (Hellgren, 2010), ayuda a prevenir ciertos tipos de cáncer (Islam y col., 2015; Liska y col., 2012; Price y col., 2010; Renner y col., 2013; Tang y col., 2007), presenta efectos inmunomoduladores (Nakanishi y col., 2016) y contribuye a un incremento de la diferenciación de la grasa parda (Schlüter y col., 2002a, Wu y col., 2013).

Tabla 21. Trabajos recientes sobre los beneficios del consumo de ácido fitánico

Referencia	Diseño del estudio	Número y tipo de muestra	Conclusión principal
Che y col., 2013b	<i>In vitro</i>	Células porcinas	El AF puede desempeñar un papel en la estimulación de la captación de glucosa en células musculares porcinas

Elmazar y col., 2013	<i>In vivo</i>	Adultos de ratas albinas Wistar macho	Fitol y AF muestran actividad antidiabética
Heim y col., 2002	<i>In vitro</i>	Células CV-1 y C3H10T1 / 2	El AF tiene un papel potencial en el tratamiento de la resistencia a la insulina
Liska y col., 2012	<i>In vivo</i>	Ratas hembra Sprague-Dawley	Seocalcitol en combinación con AF inhibió la progresión de tumores de mama
Price y col., 2010	Ensayo clínico	566 pacientes con cáncer de próstata y 566 controles	La concentración de AF en plasma no se asocia de manera significativa con riesgo de cáncer de próstata
Renner y col. (2013)	<i>In vitro</i>	Células sanguíneas bovinas	El AF causa la inhibición de la proliferación de células mononucleares
Schlüter y col., 2002a	<i>In vitro</i>	Líneas celulares AGN19420 y BRL49653	AF puede actuar como un retinoide natural en las células adiposas, lo que sugiere un uso potencial en el tratamiento de la diabetes tipo 2 humana y la obesidad
Schlüter y col. 2002b	<i>In vitro</i>	Líneas celulares AGN19420 y BRL49653	El AF es un activador de la transcripción de la proteína desacoplante 1 y la diferenciación de los adipocitos de la grasa parda
Tang y col., 2007	<i>In vitro</i>	Células epiteliales normales y de carcinoma de la próstata humana	El AF inhibe la proliferación de células PC-3 en el carcinoma de próstata

Zomer y col., 2000	<i>In vitro</i>	Células COS-1 del mono y células HepG2 humanos	Los resultados demuestran que tanto el ácido pristánico como el AF son ligandos de origen natural para PPAR, que están presentes en concentraciones fisiológicas.
-----------------------	-----------------	---	--

---

AF: Ácido fitánico; PPAR: Proliferador de peroxisoma activados los receptores

#### 4.2.5. Perspectivas de futuro y conclusiones

Tal y como se he mostrado, la bibliografía actualmente disponible apoya la hipótesis de que el consumo de AF a través de la alimentación, podría desempeñar un papel importante para mejorar el perfil metabólico. Por lo tanto, debido a la alta prevalencia de diabetes tipo 2 y del síndrome metabólico en los países desarrollados, debería resultar atractiva la inclusión de “*productos altos en ácido fitánico*” en la dieta de los consumidores de riesgo. No obstante, existen varios puntos controvertidos que necesitan ser aclarados en profundidad antes de poder afirmar que sería ventajoso recomendar el consumo de este ácido graso entre la población en general. En primer lugar, es muy importante que los efectos sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos que se han demostrado tanto en ensayos *in vitro* como en modelos animales, se validen en ensayos de intervención en humanos. Es evidente que los resultados de dichos estudios deben ser tomados con cautela, ya que en muchos casos, ni los ensayos *in vitro* ni en animales de experimentación son directamente extrapolables a los seres humanos. Además, las posibles desventajas de la ingesta del AF en las personas que no pueden eliminarlo correctamente, en especial, las relacionadas con los efectos neurológicos, deben tenerse muy en cuenta antes de recomendar el desarrollo de los “*productos altos en ácido fitánico*” o establecer una relación directa entre el AF con menciones positivas, tales como los “*alimentos ecológicos*”. Del mismo modo, sería muy conveniente prestar más atención al contenido de AF de los alimentos en las bases de datos de su composición, particularmente en las zonas geográficas

en las que predomina la DAr o la DA, que contienen niveles mucho más elevados de AF que otras dietas occidentales.

#### **4.3. DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LOS EFECTOS DE NIVELES RESIDUALES DE ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA HUMANA MEDIANTE CULTIVOS PUROS**

Tal y como se describió en el apartado correspondiente a los materiales y métodos empleados, los estudios conducentes a la determinación de los efectos que ejercen los residuos de antibióticos sobre la MI humana se realizaron con tres antibióticos de familias diferentes. Dichas familias son las tetraciclinas, los  $\beta$ -lactámicos y las sulfamidas.

##### **4.3.1. Evaluación *in vitro* de niveles residuales de tetraciclina en los alimentos sobre la microbiota intestinal humana mediante cultivos puros**

En este trabajo se ha investigado, *in vitro*, el efecto que las concentraciones residuales de tetraciclina presentes en los alimentos según los LMR establecidos en la legislación europea podrían tener sobre la MI humana. Los resultados obtenidos, se muestran en la **Tabla 22**, dónde se puede observar el crecimiento bacteriano (ufc/ml) de principales cepas bacterianas representativas del intestino humano que tenemos tras la administración o no de tetraciclina en la dosis LMR.

Tabla 22. Crecimiento bacteriano (log ufc /ml) de cultivos puros en presencia (100µg/L) o ausencia (control) de tetraciclina.

Cepas bacterianas	Crecimiento bacteriano (log ufc/mL)	
	C	T
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSMZ 20016	8,7 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,24 ± 0,14 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v (DSMZ 9843)	9,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	8,63 ± 0,08 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAFTI® L26	8,13 ± 0,22 <sup>a</sup>	7,85 ± 0,14 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i> DT24	9,00 ± 0,10	8,84 ± 0,03
<i>Lactobacillus casei</i> 431®	8,66 ± 0,07	8,51 ± 0,03
<i>Lactobacillus salivarius</i> DSM 20555	8,96 ± 0,11	8,80 ± 0,05
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI® L10	8,36 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,08 ± 0,08 <sup>b</sup>
<i>Clostridium perfringens</i> CECT 376	8,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,93 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 4503	8,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,34 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i> CECT 194	11,46 ± 0,02	11,24 ± 0,05
<i>Bacteroides vulgatus</i> LMG 17767	8,32 ± 0,03	8,33 ± 0,01

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 2). <sup>a-b</sup>: Los resultados en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. C= grupo control; T=grupo con tetraciclina. ATCC: American Type Culture Collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares); LMG: Bacterial collection/BCCM: Laboratory of Microorganism of Ghent University /Belgium Coordinated. (Laboratorio de Microorganismos de la Universidad de Gante coordinado por Bélgica)

Los resultados obtenidos con los cultivos puros, en las diferentes cepas estudiadas, muestran que en algunas cepas de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. sufrieron una variación significativa en su crecimiento, disminuyendo en los tratados con tetraciclina con respecto a los controles. Además, también se comprobó que las concentraciones de tetraciclina empleadas fueron capaces de inhibir parcialmente el

crecimiento de otras especies bacterianas diferentes de los probióticos, como fue el caso del *Clostridium perfringens*. Los lactobacilos y las bifidobacterias son, entre las diferentes especies del intestino humano, aquellas que se consideran claramente beneficiosas (Philips, 2009), ya que desempeñan un papel importante en el mantenimiento y la protección de la salud humana. Una disminución de su población, causando un desequilibrio en el ecosistema, está relacionada, por lo tanto, con el desarrollo de diferentes enfermedades (Arbolea y col., 2016).

Basándonos en los resultados obtenidos, debería ser lógico pensar que una exposición a largo plazo a 100 µg/L de tetraciclina podría afectar a la población bacteriana y provocar un desequilibrio en el ecosistema microbiano intestinal.

#### 4.3.2. Evaluación *in vitro* de niveles residuales de ampicilina en los alimentos sobre la microbiota intestinal humana mediante cultivos puros

Para comprobar el efecto que tiene la ampicilina a dosis LMR en cepas bacterianas características de la microbiota intestinal, se procedió a realizar el mismo ensayo *in vitro* que en el caso de la tetraciclina con cultivos puros. Los resultados del crecimiento bacteriano se muestran en la siguiente **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Crecimiento bacteriano de cepas bacterianas puras en presencia (50µg/L) o ausencia de ampicilina.

Cepas bacterianas	Crecimiento bacteriano (log cfu/mL)	
	C	A
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSMZ 20016	9,57 ± 0,14 <sup>a</sup>	8,74 ± 0,06 <sup>b</sup>



<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v (DSMZ 9843)	11,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,07 ± 0,02 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAFTI® L26	9,78 ± 0,03 <sup>a</sup>	8,00 ± 0,03 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i> DT24	10,26 ± 0,08 <sup>a</sup>	8,65 ± 0,02 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> 431®	9,76 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,18 ± 0,01 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> DSM 20555	9,26 ± 0,02 <sup>a</sup>	8,92 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI® L10	10,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,39 ± 0,07 <sup>b</sup>
<i>Clostridium perfringens</i> CECT 376	11,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,57 ± 0,01 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 4503	8,56 ± 0,06	8,55 ± 0,05
<i>Enterobacter cloacae</i> CECT 194	10,89 ± 0,08	10,97 ± 0,02
<i>Bacteroides vulgatus</i> LMG 17767	11,04 ± 0,09 <sup>a</sup>	10,43 ± 0,05 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 2).<sup>a-b</sup>: Los resultados en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. C= grupo control; A=grupo con ampicilina. ATCC: American Type Culture Collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares); LMG: Bacterial collection/BCCM: Laboratory of Microorganism of Ghent University /Belgium Coordinated. (Laboratorio de Microorganismos de la Universidad de Gante coordinado por Bélgica)

Como se puede observar, todas las cepas tuvieron un crecimiento reducido en presencia del antibiótico ampicilina con la excepción de *Bifidobacterium longum* y *Enterobacter cloacae*, en las cuales la presencia del antibiótico no afectó a su crecimiento. Al igual que han señalado previamente otros autores (Panda y col., 2014) la ampicilina, al igual que otros β-lactámicos, mostró actividad ante gran parte de las cepas estudiadas, debido a su amplio espectro. Como otros autores han publicado previamente, debido a los importantes efectos que muestran sobre la MI incluso a bajas dosis, los β-lactámicos han sido relacionados con obesidad inducida por la dieta, y modificación de parámetros tan importantes en el estado nutricional de las personas como son la expresión de algunos genes a nivel hepático, y la modificación de niveles hormonales (Cox y col., 2014). Este hecho es muy importante, ya que los β-lactámicos no sólo son muy empleados en medicina

veterinaria (Riley y col., 2013), sino que son el grupo de antibióticos más prescritos para la población infantil (Chai y col., 2012). Por este motivo, el uso de esta familia de antibióticos, podría ser uno de los factores que está contribuyendo al incremento de la obesidad infantil en los países desarrollados (Cox y col., 2014).

#### 4.3.3. Evaluación *in vitro* de niveles residuales de sulfadiacina en los alimentos sobre la microbiota intestinal humana mediante cultivos puros

La siguiente **Tabla 24** muestra los resultados obtenidos a partir de los ensayos desarrollados con cultivos puros, en este caso, añadiendo a las mismas cepas bacterianas, sulfadiacina y comparando su crecimiento con el control.

**Tabla 24. Crecimiento bacteriano de cepas bacterianas puras en presencia o ausencia de sulfadiacina.**

Cepas bacterianas	Crecimiento bacteriano (log ufc/mL)	
	C	S
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSMZ 20016	8,81 ± 0,13	8,95 ± 0,06
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v (DSMZ 9843)	9,20 ± 0,03	9,16 ± 0,13
<i>Lactobacillus paracasei</i> LAFTI® L26	9,10 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,70 ± 0,13 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i> DT24	8,57 ± 0,06	8,58 ± 0,04
<i>Lactobacillus casei</i> 431®	9,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,64 ± 0,01 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> DSM 20555	8,96 ± 0,10	8,92 ± 0,02
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LAFTI® L10	8,54 ± 0,06	8,59 ± 0,02
<i>Clostridium perfringens</i> CECT 376	11,58 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,91 ± 0,02 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 4503	8,65 ± 0,07	8,67 ± 0,07

<i>Enterobacter cloacae</i> CECT 194	10,63 ± 0,06	10,70 ± 0,02
<i>Bacteroides vulgatus</i> LMG 17767	9,49 ± 0,01	9,31 ± 0,06

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 2).<sup>a-b</sup>: Los resultados en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. C= grupo control; S=grupo con sulfadiacina. ATCC: American Type Culture Collection; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares); LMG: Bacterial collection/BCCM: Laboratory of Microorganism of Ghent University /Belgium Coordinated. (Laboratorio de Microorganismos de la Universidad de Gante coordinado por Bélgica)

Con respecto a los resultados obtenidos para el antibiótico sulfadiacina, el efecto fue menor, ya que solo en tres de las cepas estudiadas, se percibe la afectación en su crecimiento. Estas cepas fueron *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Clostridium perfringens*. Dado que las sulfamidas son el primer grupo de antibióticos que desarrolló el hombre (Domagk y col., 1935), llevan muchas décadas siendo muy utilizadas, por lo que su efectividad ha disminuido bastante debido al desarrollo de resistencias a esta familia de antibióticos. Quizás por ello, su uso en medicina veterinaria es hoy en día mucho mayor que en el caso de la medicina humana (Grave y col., 2014). No obstante, el hecho de que si se haya comprobado que son capaces de inhibir el crecimiento de dos cepas diferentes de *Lactobacillus* spp, demuestra que la presencia de residuos de esta familia de antibióticos puede tener efectos significativos sobre la MI humana.

#### **4.4. DETERMINACIÓN IN VITRO DE LOS EFECTOS DE NIVELES RESIDUALES DE ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA HUMANA MEDIANTE CULTIVOS MIXTOS**

Una vez se pudo determinar que los tres antibióticos estudiados tuvieron la capacidad de inhibir parcialmente el crecimiento de algunas de las cepas de cultivos puros, se procedió al estudio de los efectos de dichos antibióticos sobre muestras de heces de tres sujetos voluntarios. Para ello, se simuló *in vitro* la fermentación en la parte distal del colon durante 24 h. Tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos, se tomaron muestras en el tiempo 0 y a las 24 h tras añadir el antibiótico en el caso de los tratados, o sin adicción de antibiótico en el caso control. A continuación, se muestran en los diferentes apartados los resultados obtenidos para el caso de las muestras control (**Tabla 25**), de las muestras adicionadas con tetraciclina (**Tabla 26**), con ampicilina (**Tabla 28**), y con sulfadiacina (**Tabla 30**).

#### 4.4.1. Evolución *in vitro* de la microbiota intestinal humana sin adicción de antibiótico

Como primera determinación, se comprobó cual fue la evolución de la MI de los sujetos voluntarios sin añadir ningún antibiótico en el sistema de fermentación *in vitro*. Los resultados obtenidos podemos observarlos en la **Tabla 25**.

**Tabla 25. Resultados obtenidos en el estudio de evolución de la microbiota colónica humana sin adicción de antibiótico**

Grupo bacteriano	Recuentos 0 h	Recuentos 24 h
Microbiota total	9,16 ± 0,31 <sup>b</sup>	9,97 ± 0,71 <sup>a</sup>
Firmicutes	8,5 ± 0,64 <sup>b</sup>	9,46 ± 1,01 <sup>a</sup>
Bacteroidetes	6,3 ± 0,04 <sup>b</sup>	7,26 ± 0,64 <sup>a</sup>
Proteobacteria	4,61 ± 0,48	4,60 ± 0,11
Actinobacteria	8,01 ± 0,69	8,41 ± 0,39
<i>Bacteroides</i> spp.	6,61 ± 0,36 <sup>a</sup>	7,66 ± 0,54 <sup>b</sup>

<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,55 ± 0,64	4,13 ± 0,76
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,12 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,74 ± 0,31 <sup>b</sup>

\* Los resultados se expresan sobre log ufc/g ± desviación estándar. Todos los experimentos se replicaron tres veces (con duplicados).

Tal y como se puede observar en los resultados mostrados en la **Tabla 25**, en el caso de la microbiota colónica de los sujetos controles, tanto la microbiota total como los dos filos predominantes (Firmicutes y Bacteroidetes) tienen tendencia a incrementarse a medida que aumenta el tiempo de permanencia en la porción distal del colon. Este resultado es acorde con lo publicado por otros autores recientemente (Conlon y Bird, 2015; Le Chatellier y col., 2013). Otros filos como Actinobacteria o Proteobacteria mostraron un comportamiento más constante, sin grandes variaciones, mientras que con respecto a los tres géneros que específicamente incluimos en el estudio (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp.), mostraron un comportamiento muy diferente. Por una parte, *Bacteroides* spp., como representante mayoritario del filo de Bacteroidetes (Panda y col., 2014), siguió la misma tendencia al alza de dicho filo. Por el contrario, tanto *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., dos géneros que a menudo han sido relacionados con la salud humana (Cresci y Bawden, 2016; Johns y col., 2014), mostraron una clara tendencia al descenso. Esta tendencia al descenso fue mucho más clara y alcanzó niveles estadísticamente significativos en el caso de los *Lactobacillus* spp., mientras que en el caso de los *Bifidobacterium* spp. no llegó a alcanzar niveles estadísticamente significativos. Este descenso en los sujetos controles, apoya lo publicado previamente por otros autores (Cresci y Bawden, 2016; Wu y col., 2015) sobre la necesidad de mantener una ingesta regular de aquellos alimentos en los cuales dichos géneros están habitualmente presentes.

Cabe señalar también, que las cantidades relativas de Firmicutes y Bacteroidetes, así como la relación entre ambos se corresponde con la publicada para personas con una dieta rica en productos de origen animal (Aurumugam y col., 2011; Conlon y Bird, 2015).

#### 4.4.2. Evolución *in vitro* de la microbiota intestinal humana con adición de tetraciclina

Con respecto a los efectos obtenidos de la presencia de bajas dosis de tetraciclina, los resultados obtenidos podemos observarlos en la **Tabla 26**.

**Tabla 26. Resultados obtenidos en el estudio de la presencia de tetraciclina sobre la evolución de la microbiota colónica humana**

Grupo bacteriano	Recuentos 0 h	Recuentos 24 h
Microbiota total	9,09 ± 0,39	9,29 ± 0,40
Firmicutes	8,4 ± 0,52 <sup>b</sup>	8,87 ± 0,38 <sup>a</sup>
Bacteroidetes	6,57 ± 0,34 <sup>a</sup>	4,46 ± 0,45 <sup>b</sup>
Proteobacteria	4,57 ± 0,25 <sup>b</sup>	4,80 ± 0,11 <sup>a</sup>
Actinobacteria	8,6 ± 0,80 <sup>a</sup>	8,16 ± 0,65 <sup>b</sup>
<i>Bacteroides</i> spp.	8,22 ± 0,36 <sup>a</sup>	5,97 ± 0,26 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,18 ± 1,28	4,09 ± 0,03
<i>Lactobacillus</i> spp.	4,39 ± 0,38 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,52 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan sobre log ufc/g ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>: Los resultados en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

En presencia de tetraciclina, el comportamiento de los diferentes grupos bacterianos estudiados, en términos de crecimiento, se modificó con respecto a lo obtenido para los controles. Así, la microbiota total y el filo Firmicutes aumentaron en menor medida cuando la tetraciclina estaba presente con respecto a los controles.

Por el contrario, encontramos descensos significativos en la presencia de bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes y al filo

Actinobacteria. Dado que, en adultos sanos, el 80% de la MI puede clasificarse en tres filos dominantes: Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria (Lay y col., 2005), un descenso significativo en dos de los filos principales, podría causar una disbiosis en la MI que origine problemas de salud para el hospedador. En especial, teniendo en cuenta que la cantidad de Firmicutes se mantiene estable en presencia de tetraciclina, y sin embargo, encontramos descensos en la cantidad de Bacteroidetes que provoca como consecuencia un incremento en el FBR. Este hecho, ha sido relacionado por varios autores con un mayor riesgo de obesidad y trastornos metabólicos (Conlon y Bird, 2015; Ley y col., 2005; Ley y col., 2006).

En este sentido, resultados obtenidos en la **Tabla 27** para el FBR mostraron diferencias para la microbiota expuesta a la tetraciclina con respecto al control.

**Tabla 27. Ratio Firmicutes (F): Bacteroidetes (B) calculado en las muestras controles y en las expuestas a tetraciclina.**

Tiempo (h)	Ratio Firmicutes (F) : Bacteroidetes (B)	
	Control	Tetraciclina
0	22,38 ± 1,29	19,17 ± 1,36
24	20,31 ± 1,43	99,84* ± 1,57

Los resultados son expresados como promedio ± y desviación estándar (n=6).

\*Diferencias estadísticas significativas a un nivel de  $P < 0,05$ .

Los resultados demostraron que el FBR varía de un modo importante ante la presencia de residuos de tetraciclina, lo cual es de relevancia significativa en el estado de la MI humana (Ley y col., 2006). Además, son acordes con lo publicado anteriormente por otros autores

(Conlon y Bird, 2015; Cresci y Bawden, 2015; Singh y col., 2016), que muestran un predominio en el filo Firmicutes y por lo tanto mayor FBR. Esto es frecuente en personas que viven en países desarrollados, con una dieta occidental estándar (Singh y col., 2016; Voreades y col., 2014) como también, en los sujetos obesos ya que se ha demostrado que éstos suelen presentar una relación superior del FBR que los individuos delgados (Tilg y Kaser, 2011).

Con respecto a las bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria, los resultados mostraron un ligero aumento, si bien éste no resultó ser estadísticamente significativo. El filo Proteobacteria es habitualmente el más inestable a lo largo del tiempo, entre los cuatro filos principales (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria) en la MI de las personas (Faith y col., 2013). En un estado saludable, la abundancia relativa de Proteobacteria en el intestino humano representa alrededor del 2,5% de la MI, si bien en algunos casos puede llegar a representar hasta el 45% sin que se manifiesten en la persona signos clínicos (Caporaso y col., 2011).

La proporción de Proteobacteria en la MI es sensible a factores ambientales, como la dieta. Algunos autores han señalado que una proporción incrementada de Proteobacteria en la MI durante bastante tiempo, puede tomarse como una señal de disbiosis (Fei y Zhao, 2013). Entre otros, puede ser una señal de que el sujeto esté padeciendo tanto diversos trastornos metabólicos (Fei y Zhao, 2013) como inflamación intestinal (Morgan y col., 2012). De hecho, investigaciones más recientes (Abdou y col., 2016), han señalado a este filo bacteriano como causa de lo que recientemente se ha denominado “*inflamación crónica de baja intensidad*” en el intestino grueso.

Adicionalmente a esto y como han señalado previamente otros autores, esta familia bacteriana, que incluye la mayor parte de las Enterobacterias patógenas para el ser humano (Clemente y col., 2012; Power y col., 2014) es el filo que mayor proporción de genes de resistencia a antimicrobianos acumula. En este sentido, trabajos metagenómicos previos han publicado que, el filo Proteobacteria, a



pesar de que son una parte minoritaria de la MI, acumulan más del 35% de los genes de resistencia a antibióticos contenidos en el microbioma. En contraposición, por ejemplo los Bacteroidetes, a pesar de representar alrededor del 30% de la microbiota total, sólo acumulan el 6% de los genes de resistencia a antibióticos (Hu y col., 2013). De este modo, si tenemos en cuenta que los genes de resistencia a tetraciclina son los más extendidos entre la población bacteriana (Hu y col., 2013), y que esta familia es la que más genes de resistencia acumula, es razonable pensar que una exposición a tetraciclina suponga una ventaja competitiva para Proteobacteria en relación a otros filos bacterianos más sensibles a la acción de este antibiótico.

Finalmente, no se encontró ninguna variación significativa en el contenido en *Bifidobacterium* spp. e incluso se encontró un incremento en la presencia de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. Este diferente comportamiento, incrementándose algunos grupos bacterianos estudiados que tradicionalmente presenta una gran sensibilidad a la acción de los antibióticos, puede deberse al amplio historial de uso de las tetraciclinas (Miranda y col., 2008), y su ya mencionado elevado número de genes que codifican resistencia a estas sustancias (Hu y col., 2013). La mayor parte de dichos genes codifican la expresión bombas de expulsión de antibiótico fuera de la célula bacteriana (Chopra y Roberts, 2001). Por este motivo, la mayor presencia de genes de resistencia a la tetraciclina (generalmente conocidos como *tet* genes) (Guarddon y col., 2011), podría originar una ventaja competitiva a las bacterias que son portadoras de los mismos, que de este modo se harían predominantes dentro de la microbiota.

En resumen, los experimentos desarrollados *in vitro* demostraron que la presencia de tetraciclina en el intestino grueso, aún a bajas concentraciones, podría afectar al filo Proteobacteria y de este modo causar un estado de disbiosis en la MI a través del consumo de trazas de antibióticos presentes en los alimentos.

Cabe señalar también que no es ni mucho menos la primera vez que la exposición a un antibiótico provoca un incremento en grupos

bacterianos incluidos en la microbiota intestinal humana o en animales de experimentación (Hu y col., 2013). De este modo, Russel y col., (2012) observaron un marcado incremento en la población de *Lactobacillus* spp. (igual que en este caso) tras la exposición de la microbiota de ratones a vancomicina y estreptomicina. También se ha encontrado de manera reiterada incrementos en los recuentos de las bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria como consecuencia de la administración de diferentes tipos de antibióticos (Cho y col., 2012; Cox y col., 2014; Hu y col., 2013), además de un incremento en el FBR (Cho y col., 2012).

#### 4.4.3. Evolución *in vitro* de la microbiota intestinal humana con adición de ampicilina

Con respecto a los efectos obtenidos en la simulación *in vitro* tras la exposición a bajas dosis de ampicilina, los resultados obtenidos podemos observarlos en la **Tabla 28**.

**Tabla 28. Resultados obtenidos en el estudio de la presencia de ampicilina sobre la evolución de la microbiota colónica humana.**

Grupo bacteriano	Recuentos 0 h	Recuentos 24 h
Microbiota total	8,91 ± 0,64	8,86 ± 0,37
Firmicutes	8,72 ± 0,07	8,29 ± 0,40
Bacteroidetes	7,08 ± 0,39 <sup>a</sup>	5,96 ± 0,24 <sup>b</sup>
Proteobacteria	4,43 ± 0,15	4,23 ± 0,22
Actinobacteria	7,97 ± 0,23	8,13 ± 0,64
<i>Bacteroides</i> spp.	7,27 ± 0,44 <sup>a</sup>	6,26 ± 0,35 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,43 ± 0,37 <sup>a</sup>	3,45 ± 0,97 <sup>b</sup>

*Lactobacillus* spp.5,05 ± 0,64<sup>a</sup>4,01 ± 0,46<sup>b</sup>

Los resultados se expresan sobre log ufc/g ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>: Los resultados en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

Como se puede ver en la **Tabla 28**, la evolución de la MI cuando se expone a ampicilina, aun cuando se utilizan concentraciones LMR permitidos según la legislación europea, evoluciona de un modo diferente a lo que ocurre en el caso de las muestras controles. Por una parte, la microbiota total no aumenta de manera significativa, al contrario de lo que ocurría en el caso de los inóculos empleados como controles, sino que se mantiene estable durante las 24 horas en las que fue estudiada su evolución. Lo mismo ocurre con las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes. Más interesante aún es el hecho de que las bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes disminuyen de modo significativo, y a diferencia de las pruebas controles, en este caso tanto los *Bifidobacterium* spp. como los *Lactobacillus* spp. sufren un descenso significativo en sus recuentos. Tomando los datos en su conjunto, podemos concluir que la presencia de bajas concentraciones de ampicilina produjo cierto nivel de disbiosis en las muestras empleadas (Ajslev y col., 2011; Gupta y col., 2016). Este cierto grado de disbiosis se manifestó en que al descender los recuentos de las bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes, y mantenerse estables los recuentos de las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, el FBR se incrementó (**Tabla 29**), y con él la probabilidad de incrementar la adiposidad corporal y la tendencia a la obesidad (Cox y col., 2014; Mikkelsen y col., 2015; Trasandre y col., 2013). Del mismo modo, el hecho de que tanto *Bifidobacterium* spp. como *Lactobacillus* spp. descendan de un modo significativo y más pronunciado que en el caso de los controles agrava todavía más el estado de disbiosis y la predisposición a sufrir enfermedades crónicas relacionas tanto con el estado nutricional como inmune del sujeto (Gupta y col., 2015).

Los resultados obtenidos en la **Tabla 29** para el FBR mostraron diferencias para la microbiota expuesta a la ampicilina con respecto al control.

**Tabla 29. Ratio Firmicutes (F): Bacteroidetes (B) calculado en las muestras controles y en las expuestas a ampicilina.**

Tiempo (h)	Ratio Firmicutes (F) : Bacteroidetes (B)	
	Control	Ampicilina
0	22,38 ± 1,29	43,65 ± 2,57
24	20,31 ± 1,43	213,81* ± 10,13

Los resultados son expresados como promedio ± y desviación estándar (n=6). \* Diferencias estadísticas significativas a un nivel de  $P < 0,05$ .

#### 4.4.4. Evolución *in vitro* de la microbiota intestinal humana con adición de sulfadiacina

Con respecto a los efectos obtenidos de la presencia de bajas dosis de sulfadiacina, los resultados obtenidos podemos observarlos en la **Tabla 30**.

**Tabla 30. Resultados obtenidos en el estudio de la presencia de sulfadiacina sobre la evolución de la microbiota colónica humana**

Grupo bacteriano	Recuentos 0 h	Recuentos 24 h
Microbiota total	8,86 ± 0,31 <sup>b</sup>	9,24 ± 0,34 <sup>a</sup>

Firmicutes	8,38 ± 0,40 <sup>b</sup>	8,97 ± 0,30 <sup>a</sup>
Bacteroidetes	7,26 ± 0,54	7,44 ± 0,31
Proteobacteria	4,30 ± 0,17	4,20 ± 0,10
Actinobacteria	8,01 ± 0,40	7,63 ± 0,06
<i>Bacteroides</i> spp.	6,58 ± 0,66 <sup>a</sup>	5,86 ± 0,63 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	3,86 ± 0,47	4,08 ± 0,45
<i>Lactobacillus</i> spp.	4,89 ± 0,78 <sup>b</sup>	5,49 ± 0,46 <sup>a</sup>

Los resultados se expresan sobre log ufc/g ± desviación estándar. <sup>a-b</sup>: Los resultados en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas.

Como se puede observar en la **Tabla 30**, la evolución de la microbiota en este caso es muy semejante a la que obtuvimos en las muestras utilizadas como controles, sin adición alguna de antibiótico. Al igual que en los controles, se observa un ligero incremento en los recuentos totales, un incremento algo más significativo en la presencia de bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, con un consecuente incremento en el FBR (**Tabla 31**). La presencia de bacterias pertenecientes al género *Bacteroides* spp. disminuyen, mientras que al igual que en el caso de la tetraciclina, y que en el trabajo realizado por Russel y col (2012), la presencia de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. aumenta bajo la acción del antimicrobiano. Este resultado no deja de ser en cierto modo sorpresivo, ya que este género bacteriano está normalmente asociado con la presencia de una microbiota saludable, y en muchos casos anteriores han sido publicados descensos provocados a la acción de diversos grupos de antibióticos (Arbolea y col., 2014; Cox y col., 2014; Greenwood y col., 2014).

En términos generales, los resultados obtenidos son coherentes con el hecho de que las sulfamidas fueron el primer grupo antibiótico descubierto y se llevan empleando desde la década de los años 40 del siglo pasado, con la consiguiente pérdida de eficacia derivado de su

largo uso (Miranda y col., 2008). De hecho, trabajos realizados hace aproximadamente una década ya mostraban tasas de resistencia a este grupo de antibióticos por parte de bacterias de origen intestinal superiores al 70% (Miranda y col., 2007).

**Tabla 31. Ratio Firmicutes (F): Bacteroidetes (B) calculado en las muestras controles y en las expuestas a sulfadiazina.**

Tiempo (h)	Ratio Firmicutes (F) : Bacteroidetes (B)	
	Control	Sulfadiazina
0	22,38 ± 1,29	13,38 ± 1,46
24	20,31 ± 1,43	33,88* ± 2,12

**Los resultados son expresados como promedio ± y desviación estándar (n=6).**

**\*Diferencias estadísticas significativas a un nivel de  $P < 0,05$ .**

Tal y como se puede observar en los resultados obtenidos, tanto en el grupo control como en los empleados para el estudio de cada uno de los tres antibióticos estudiados, el recuento total obtenido es claramente inferior a lo publicado como habitual por otros autores previamente (Abdou y col., 2016). No obstante, debemos tener en cuenta que el método empleado lo que mide en realidad son copias de ADN, por lo que su extrapolación directa a ufc/g o log ufc/g no es siempre aplicable, ya que una misma célula bacteriana puede contener una o más copias del ADN diana (Guarddon y col., 2011). Por este motivo, podríamos estar midiendo varias veces el mismo ADN en el cultivo puro y menos veces dicho ADN diana en las muestras reales (Guarddon y col., 2011). Las muestras reales, al contener mucha materia orgánica, son siempre

matrices mucho más complejas y más difíciles de obtener resultados reproducibles (Friswell y col. 2010; Hermann-Bank y col. 2013).

#### **4.5. DETERMINACIÓN IN VIVO DE LOS EFECTOS DE LOS ANTIBIÓTICOS ESTUDIADOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

En los resultados que se muestran a continuación, los valores medios de las diferentes poblaciones no son del todo similares a las pruebas realizadas anteriormente *in vitro* con heces humanas ni *in vivo* con ratones, ya que la microbiota de los humanos y de los ratones es muy diferente. De hecho, algunos autores ya habían señalado recientemente, que la microbiota intestinal de ratones no siempre guarda similitud con la humana (Lin, 2011) y que cualquier extrapolación realizada a partir de los estudios en animales de experimentación, debe tomarse con cautela. Aún así, dichos estudios son imprescindibles, ya que en casos como el que nos ocupa, supone un problema de carácter ético exponer a personas a experimentar una disbiosis originada por un consumo prolongado de antibióticos.

##### **4.5.1. Efectos de los antibióticos ensayados sobre la microbiota intestinal total**

Tal y como puede observarse en la **Figura 17**, la evolución de la microbiota total en los sujetos controles resultó bastante estable a lo largo del período de estudio, oscilando entre valores de 11-11,5 log ufc/g. Estos valores son compatibles con los publicados previamente por otros autores, tanto para la microbiota total de ratones (Okubo y col., 2013) como de seres humanos (Aurumugan y col., 2011).

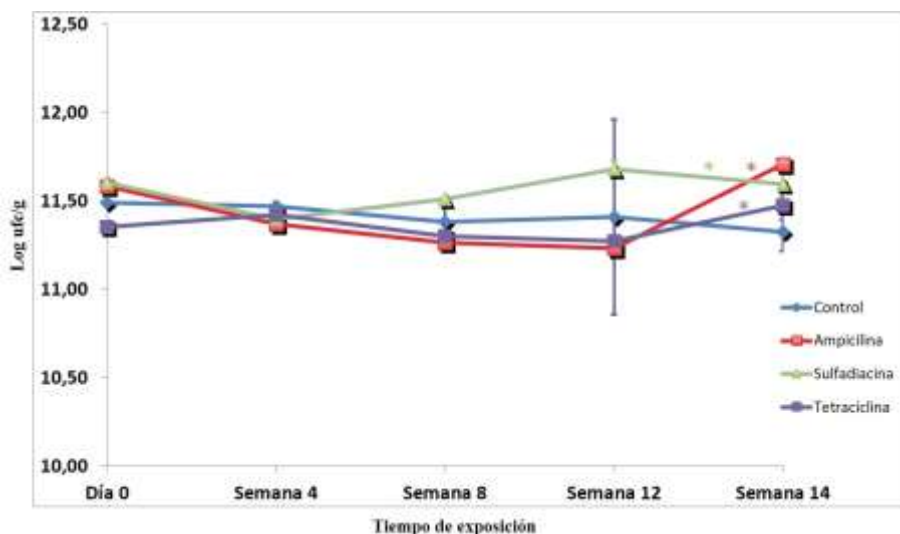


Figura 17. Evolución de la microbiota fecal de los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

En todos los casos tras la administración del antibiótico (ya sea ampicilina, sulfadiacina o tetraciclina) la evolución de la microbiota intestinal de los ratones fue estadísticamente diferente a la de los controles ( $P > 0,001$ ). De este modo, tras la administración de los antibióticos, se produjo un descenso en la microbiota total, que tras un período en el cual se situó por debajo de los sujetos controles, experimentó un incremento (a partir de la semana 8 en el caso de la sulfadiacina y en el último muestreo en el caso de la ampicilina y la tetraciclina). Es un hecho aceptado que una mayor cantidad de bacterias por gramo en el colon está relacionado con un mejor estado de salud (Abdou y col., 2016). Sin embargo, esto no siempre es así, ya que además de la cantidad de bacterias también es un factor muy importante la variedad de especies (Clemente y col., 2015; Singh y col., 2016), siendo mejor cuanto mayor es la variedad. Por ejemplo, si una especie de bacterias de pequeño tamaño es resistente a un antibiótico, la aplicación del mismo podría eliminar la flora que compite con ella y dicha especie incrementar de modo importante su número. Dado que su tamaño es inferior, podría albergar más unidades por gramo, sin que



ello suponga ventaja alguna para el hospedador (Riley y col., 2013). Por ello es importante comprobar los efectos que estos antibióticos pueden tener sobre los distintos filos y géneros que conforman dicha MI.

#### **4.5.2. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Firmicutes**

El filo Firmicutes es habitualmente el que se encuentra en mayor proporción en la MI de las personas en los países con dietas de tipo occidental (Panda y col., 2014; Power y col., 2014). En la **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos tanto en los ratones controles y en los expuestos a los diferentes antibióticos, alcanzando en algunos casos valores próximos a los de la microbiota total (en este caso oscilaron en los controles entre 10,4 y 10,8 log ufc/g). En todos los casos, la exposición a los antibióticos provocó un incremento significativo en la población de Firmicutes ( $P < 0,001$ ).



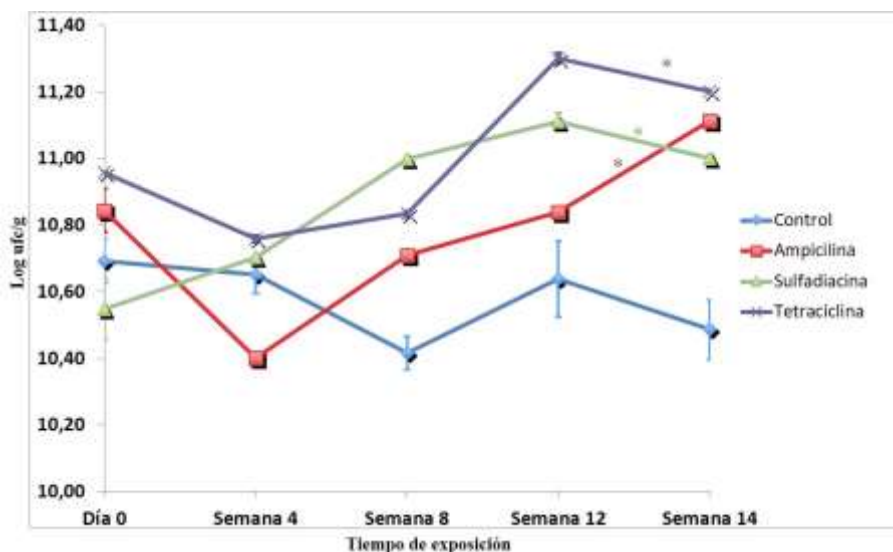


Figura 18. Evolución de los Firmicutes en los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

Este incremento en la cantidad de Firmicutes por g de contenido colónico, y por consiguiente en su proporción relativa dentro de la MI, ya fue observado previamente por otros autores en trabajos en los cuales se expuso a ratones de experimentación a diferentes tipos de antibióticos (Cho y col., 2014; Ellekilde y col., 2014; Pérez-Cobas y col., 2013; Russell y col., 2015). No obstante, esto no es siempre así, ya que algunos autores también han encontrado un descenso en la cantidad de Firmicutes consecuente a la administración de antibióticos (Vrieze y col., 2014). De modo general, los incrementos en la cantidad de Firmicutes suele considerarse como un factor obesogénico y en cierto modo, indicador de disbiosis (Arumugan y col., 2011; Le Chatellier y col., 2013).

#### 4.5.3. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Bacteroidetes

En el filo de los Bacteroidetes, los antibióticos empleados, han modificado la flora intestinal con respecto al grupo control de manera significativa, tanto en el caso de la ampicilina ( $P < 0,001$ ), de la tetraciclina ( $P < 0,001$ ), y la sulfadiacina ( $P = 0,003$ ), con una tendencia al aumento, tal y como se indica en la **Figura 19**.

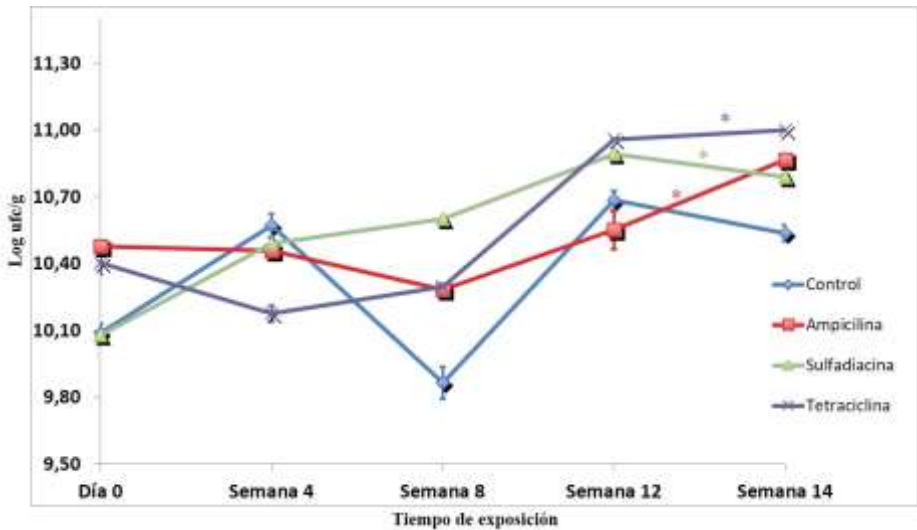


Figura 19. Evolución de los Bacteroidetes en los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

Los resultados obtenidos indican un incremento en el número de bacterias del filo Bacteroidetes con respecto al inicio del experimento y con el grupo control. Cuando comparamos este incremento en relación con el obtenido para el filo Firmicutes, los resultados muestran que en los ratones controles, la tendencia en el marco de dieta, edad y ambiente en el cual se realizó el ensayo, favorece un incremento de los Bacteroidetes con respecto a los Firmicutes. De hecho, en este grupo control, al finalizar el ensayo, sorpresivamente, la proporción de Bacteroidetes en la MI era incluso superior a la del filo Firmicutes (el ratio muestra valores inferiores a 1). Por el contrario, en los ratones

expuestos a antibióticos, dicha tendencia fue mucho menos evidente, no superando en ningún caso la proporción de Bacteroidetes en la MI a la de Firmicutes, como si ocurrió en los controles. Esta diferente evolución es totalmente imputable al efecto del antibiótico, ya que el resto de las variables fueron exactamente iguales entre los ratones controles y los tratados. Los resultados obtenidos, expresados mediante el FBR, pueden comprobarse en la **Tabla 32**:

**Tabla 32. Ratio Firmicutes (F): Bacteroidetes (B) calculado en las muestras controles y en las expuestas a los tres tipos de antibióticos.**

Tiempo (semana)	Ratio Firmicutes (F) : Bacteroidetes (B)			
	Control	Ampicilina	Tetraciclina	Sulfadiacina
0	3,98 ± 1,39	2,29 ± 1,11	2,95 ± 0,76	3,63 ± 1,19
14	0,89 ± 0,56	1,74 ± 1,12*	1,62 ± 0,72*	1,58 ± 0,89*

Los resultados son expresados como promedio ± y desviación estándar.

\*Diferencias estadísticas significativas a un nivel de  $P < 0,05$ .

Este hecho se ajusta con algunos estudios realizados en humanos con anterioridad, donde se describe que los individuos obesos tienen un mayor FBR (Ley y col., 2006; Turnbaugh y col., 2009). En otros trabajos, realizados con ratones obesos, también se encontró este incremento en el FBR, incluso en ratones que carecían la leptina, que tiene un papel crucial para la regulación del apetito (Ley y col., 2005; Murphy y col., 2010). Por otro lado, Turnbaugh y col., 2009 describieron una menor proporción de Bacteroidetes y una mayor proporción de Actinobacteria en personas obesas que en personas

delgadas, sin una diferencia significativa en la proporción de Firmicutes.

Este ratio de todos modos, no siempre arroja resultados similares, sino que estudios anteriores han mostrado discrepancias en su evolución, dada la influencia de otros factores como la edad de los ratones, el procesamiento de las muestras o los métodos de análisis (Nguyen y col., 2015) .

#### **4.5.4. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Actinobacteria**

En la **Figura 20**, se observa la representación gráfica del filo de la Actinobacteria, en el que únicamente, el antibiótico sulfadiacina afectaría a este filo de manera significativa ( $P = 0,041$ ) en este tiempo de exposición, mientras que en el caso de la ampicilina y tetraciclina no ocasionarían de manera significativa, cambios en la evolución con respecto al grupo control. Este diferente comportamiento sugiere una diferente susceptibilidad por parte de las bacterias que forman el filo Actinobacteria a los antibióticos ensayados.

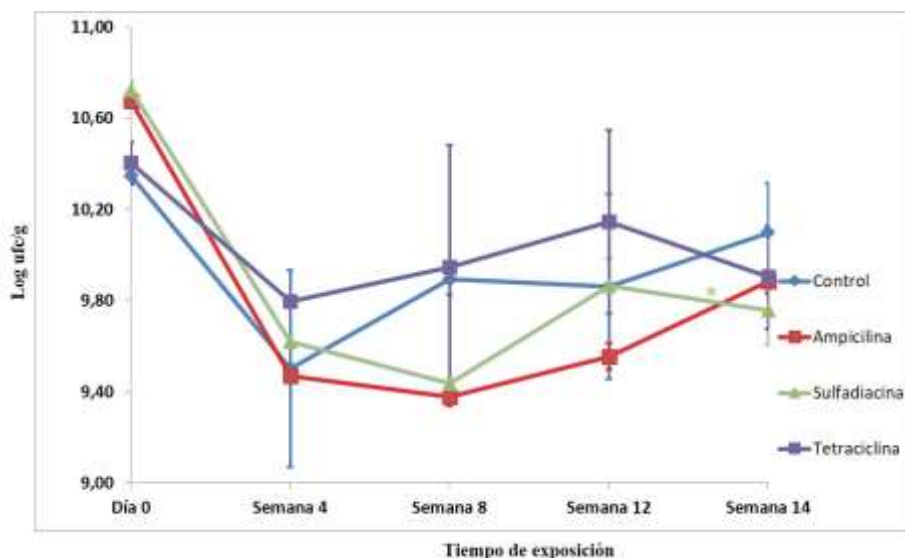


Figura 20. Evolución de las Actinobacteria en los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

Este filo, si bien no ha sido tan directamente relacionado con un estado de disbiosis obesogénica como otros, como son los Firmicutes o el filo de la Proteobacteria, si existen varios autores que han relacionado una mayor presencia de este filo con un estado obesogénico (Turnbaugh y col., 2009; Arumugan y col., 2011). De hecho, en una parte anterior de la presente tesis doctoral, uno de los factores que se ha señalado como posible causa de la mayor tendencia al sobrepeso y la obesidad entre la población gallega con respecto al resto de España, es la mayor proporción de Actinobacteria en su MI (Castro-Penaloga y col., 2017).

#### 4.5.5. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el filo Proteobacteria

En el caso del filo de la Proteobacteria, los resultados obtenidos se representan en la **Figura 21**, alcanzando diferencias significativas ( $P <$

0,001) en el tratamiento de los tres antibióticos empleados con respecto al grupo control.

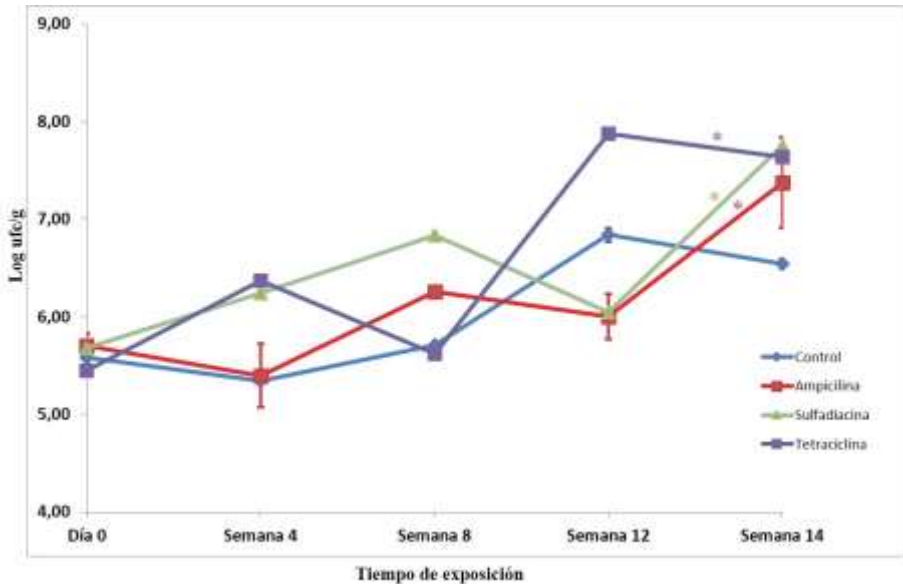


Figura 21. Evolución de las Proteobacteria en los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

El aumento observado en la proporción de Proteobacteria como consecuencia de la exposición a los tres antibióticos ensayados es uno de los factores más importantes desde el punto de vista de la generación de disbiosis, debido a su capacidad de provocar “*inflamación crónica de baja intensidad*” en el intestino grueso (Abdou y col., 2016), ya que generan gran cantidad de toxinas y metabolitos potencialmente tóxicos.

Es también un hecho consistente el que, al incluir este filo numerosas especies bacterianas patógenas, cuando se produce una proliferación de las mismas en el intestino, sea necesario el uso de antibióticos para reducir o eliminar su contenido (Murphy y col., 2013).

Quizás por este motivo, este filo es el que más genes de resistencia acumula en la MI (alrededor el 35%) (Hu y col., 2013), a pesar de que en una situación normal no representa más del 2-3% de la MI (Caporaso y col., 2011). De hecho, es una tónica habitual que en los trabajos en los cuales se expone a ratones a antibióticos con el fin de estudiar los efectos sobre su MI, el filo Proteobacteria sea uno de los grupos más afectados, produciéndose incrementos muy notables y que en algunos casos llegan hasta multiplicar por 65 su población inicial (Leclercq y col., 2107).

Una proporción de Proteobacteria en la MI incrementada y sostenida en el tiempo, puede tomarse como una señal de desequilibrio en la MI (Fei y Zhao, 2013). Entre otros, puede ser una señal de que el sujeto esté padeciendo tanto diversos trastornos metabólicos (Fei y Zhao, 2013) como inflamación intestinal (Morgan y col., 2012).

#### **4.5.6. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el género *Bifidobacterium***

En la siguiente **Figura 22** que se muestra a continuación, los antibióticos que se utilizaron en el ensayo ocasionaron modificaciones en el género *Bifidobacterium* alcanzando diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) en los tres casos con respecto al grupo control durante el tiempo de exposición.



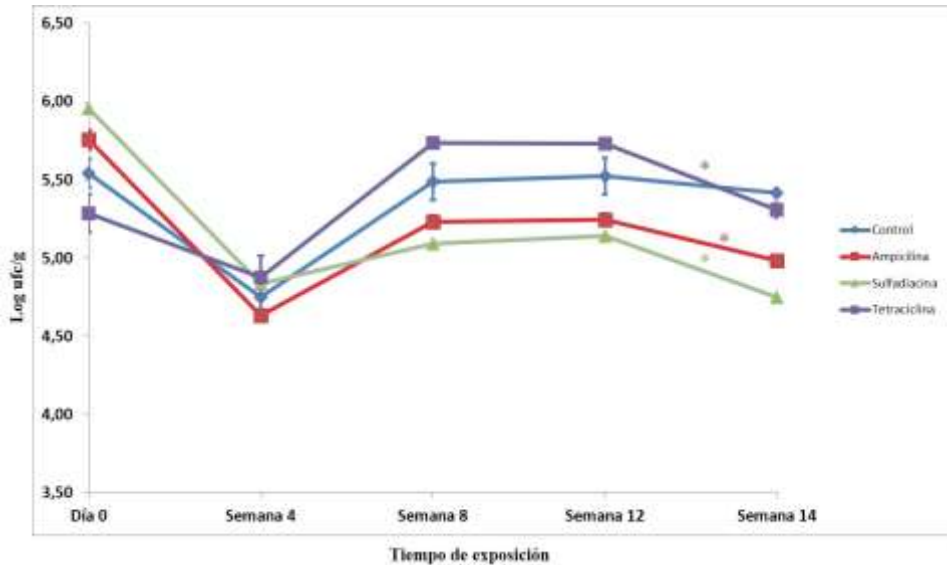


Figura 22. Evolución de los *Bifidobacterium* en los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

Los resultados obtenidos en lo referente a la cantidad de *Bifidobacterium* por g de heces fueron inferiores a los previamente publicados por Okubo y col., (2013), en los cuales los recuentos de *Bifidobacterium* en heces de la misma cepa de ratones mostró resultados de 8-10 log ufc/g.

A pesar de que la acción de los tres antibióticos ensayados ocasionó una evolución en la cantidad de *Bifidobacterium* significativamente diferente a la de los controles, no en todos los casos fue similar. Así, en el caso de la tetraciclina, los recuentos de *Bifidobacterium* inicialmente mostraron unos valores superiores, que luego al final descienden, incluso por debajo de los controles. Sin embargo, en el caso tanto de la ampicilina como de la sulfadiazina, si se puede comprobar que el antibiótico disminuye de manera más pronunciada la cantidad de *Bifidobacterium* en la MI de los ratones.

Los beneficios para la salud humana de una elevada cantidad de *Bifidobacterium* ya han sido ampliamente documentados en apartados anteriores. Por ello, los descensos que experimentan en los ratones expuestos a ampicilina y sulfadiacina reflejan cambios perjudiciales para el hospedador.

Los resultados obtenidos son compatibles con datos publicados anteriormente, como Gueimonde y col. (2015), que demostró que muchas cepas diferentes de *Bifidobacterium* habitualmente empleados como probióticos, son sensibles a concentraciones muy bajas de  $\beta$ -lactámicos, mientras que en el caso de las tetraciclinas, muchos genes *tet* se encuentran comúnmente en éste género, lo que les confiere resistencia intrínseca (Gueimonde y col., 2010). Estos resultados también fueron confirmados por otros trabajos en los cuales se comprobó el nivel de resistencia de cepas *Bifidobacterium* habitualmente empleados como probióticos a distintos tipos de antibióticos (Moubareck y col., 2005; Georgieva y col., 2015). Según dichos autores, en todos los casos ensayados las cepas de *Bifidobacterium* resultaron ser sensibles a la ampicilina (de ahí el claro descenso en los recuentos de los ratones expuestos a este antibiótico), mientras que algunas cepas muestran resistencia total o intermedia a la tetraciclina, de ahí que sus efectos no sean claros.

#### **4.5.7. Efectos de los antibióticos ensayados sobre el género *Lactobacillus***

En el caso del género *Lactobacillus* que se describe en la **Figura 23**, los antibióticos ampicilina y tetraciclina modifican la MI obteniendo diferencias significativas ( $P < 0,001$ ), por el contrario, el antibiótico sulfadiacina no causa modificaciones significativas con respecto al grupo control.

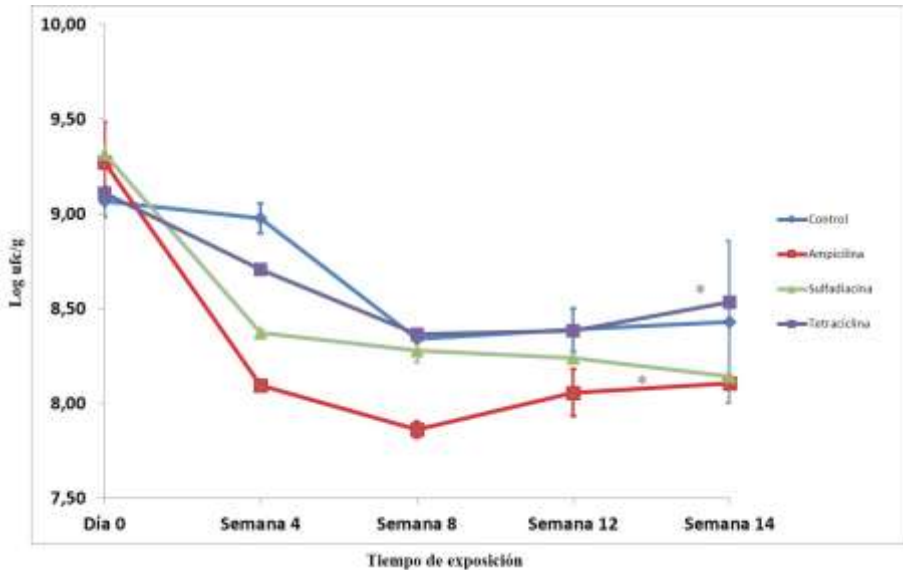


Figura 23. Evolución de los *Lactobacillus* en los ratones de experimentación controles y con antibióticos en pienso durante 14 semanas.

Los recuentos obtenidos con respecto a los *Lactobacillus* en los ratones controles son compatibles con los publicados previamente por Okubo y col., (2013), que encontró recuentos en heces que oscilaron entre 8,5-10 log ufc/g. También es normal que los recuentos de *Lactobacillus* en ratones sean superiores a los que habitualmente pueden encontrarse en heces humanas (Nguyen y col., 2015). Al igual que ocurría con el caso de los *Bifidobacterium*, este género bacteriano suele considerarse beneficioso para la salud, y también se emplea habitualmente como probiótico (Georgieva y col., 2015). No obstante, a veces también existen datos contradictorios, como el hecho de que se encontró un nivel significativamente más alto de *Lactobacillus* (del filo Firmicutes) en pacientes obesos que en sujetos delgados (Armougom y col., 2009).

La exposición de la MI de los ratones a los diferentes tipos de antimicrobianos mostró resultados diferentes, ya que no se encontró un efecto significativo en el caso de la exposición a sulfadiazina, mientras

que la exposición a ampicilina provocó un claro descenso en la población de *Lactobacillus*. Este resultado es razonable si tenemos en cuenta que muchas cepas diferentes de *Lactobacillus* son sensibles a la ampicilina (Georgieva y col., 2015). Otros trabajos previos demostraron que tanto la ampicilina como otros  $\beta$ -lactámicos disminuyeron la presencia de *Lactobacillus*, incluso a dosis muy pequeñas (Arbolea y col., 2015; Leclercq y col., 2017). No obstante, esto no ocurre con todos los antibióticos, ya que por ejemplo, Thuny y col. (2010), encontraron un incremento en la población de *Lactobacillus* subsecuente a la administración de la combinación vancomicina-gentamicina. Este hecho fue relacionado con que la vancomicina es empleada en algunos países como promotor del crecimiento, y por lo tanto, su uso en animales sea frecuente. Además, los *Lactobacillus* son generalmente más resistentes a buena parte de los antibióticos que los *Bifidobacterium* (Moubareck y col., 2005). En dicho estudio, así como en trabajos anteriores (Temmerman y col., 2003) se encontró que alrededor del 30% de las cepas de *Lactobacillus* estudiadas, resultaron ser resistentes a la tetraciclina. Quizás por este motivo, los efectos de la tetraciclina en este estudio, si bien mostraron un efecto estadísticamente significativo, no fueron tan claros ni rotundos como en el caso de la ampicilina.

#### **4.6. DETERMINACIÓN DE LOS POTENCIALES EFECTOS BENEFICIOSOS DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE UVA DE VINO BLANCO Y UVA DE VINO TINTO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA**

La evaluación del crecimiento de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se llevó a cabo con el objetivo de ver si estas bacterias eran capaces de utilizar los extractos objetos de estudio como fuente de carbono y como paso previo al estudio con inóculos fecales. Los resultados obtenidos (**Tabla 33**) mostraron que efectivamente estos

microorganismos fueron capaces de crecer en presencia de estos sustratos alcanzando valores de ufc/mL similares o incluso en algún caso superiores a los obtenidos en las mismas condiciones pero usando, los microorganismos y la glucosa como fuente de carbono (controles). Las bacterias que alcanzaron un mayor crecimiento en presencia de los sustratos y en comparación con el ensayo control fueron *L. salivarius* 20555, *L. casei* 431, *L. rhamnosus* 20021, *B. longum* 4503, *B. longum* subsp. *infantis* 4553 y *B. bifidum* 870. Una vez visto que estos sustratos eran utilizados por *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, el siguiente paso era evaluar si, en presencia de otras bacterias estos grupos bacterianos considerados beneficiosos eran igualmente capaces de utilizar los sustratos.

**Tabla 33. Concentración de las diferentes cepas bacterianas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en presencia de los extractos secos de uva blanca y tinta así como en presencia de glucosa (control).**

Cepas	Concentración bacteriana (log ufc/mL)		
	Control	ESUB	ESUT
<i>L. paracasei</i> L-26	12.78 (0.05)	11.57 (0.02)	12.56 (0.01)
<i>L. salivarius</i> 20555	10.30 (0.02)	12.21 (0.18)	12.13 (0.52)
<i>L. casei</i> 431	9.48 (0.10)	12.69 (0.14)	12.85 (0.17)
<i>L. acidophilus</i> L-10	11.96 (0.05)	9.04 (0.20)	10.51 (0.31)
<i>L. brevis</i> D-24	12.00 (0.17)	9.44 (0.05)	12.49 (0.05)
<i>L. plantarum</i> 299V	12.83 (0.04)	12.01 (0.17)	12.86 (0.02)
<i>L. rhamnosus</i> 20021	8.69 (0.54)	10.00 (0.01)	11.70 (0.14)
<i>B. longum</i> 4503	10.57 (0.14)	12.24 (0.50)	12.83 (0.02)
<i>L. reuteri</i> 20016	12.40 (0.10)	11.88 (0.04)	11.88 (0.00)

<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 4553	11.88 (0.04)	11.24 (0.14)	10.51 (0.10)
<i>B. bifidum</i> 870	9.74 (0.44)	10.88 (0.14)	10.88 (0.20)
<i>B. breve</i> 4839	12.07 (0.17)	11.40 (0.05)	12.60 (0.06)

\*Los resultados se expresan como log ufc/mL (Desviación estándar) (n=3). ESUB: Extractos secos de uva blanca; ESUT: Extractos secos de uva tinta.

#### 4.6.1. Evaluación del crecimiento de los distintos grupos bacterianos en ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos (inóculos fecales)

El objetivo del estudio de fermentación fue conocer el comportamiento de los grupos bacterianos de la MI y evaluar, sobre todo si las bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, son capaces de utilizar de manera selectiva los sustratos de residuos de uva tinta y blanca correspondientes. Los resultados se mostraron por grupos bacterianos e inóculo de manera individual, ya que el efecto bifidógeno y prebiótico no solo depende del sustrato, sino también del tipo de microbiota existente en el individuo antes del tratamiento.

Las **Figuras 24-26**, muestran los resultados obtenidos expresados como logaritmo de la concentración bacteriana a lo largo de los ensayos de fermentación. En los ensayos control (**Figura 24**), no se encontraron cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en la concentración de *Bifidobacterium* a lo largo del tiempo empleando los inóculos procedentes de los tres voluntarios. En el caso de los ensayos realizados con los dos extractos secos de uva blanca (ESUB) (**Figura 25**) y los extractos secos de uva tinta (ESUT) (**Figura 26**) si se encontraron diferencias significativas a lo largo del tiempo en la población bacteriana, mostrándose en ambos casos un crecimiento en dicha población.

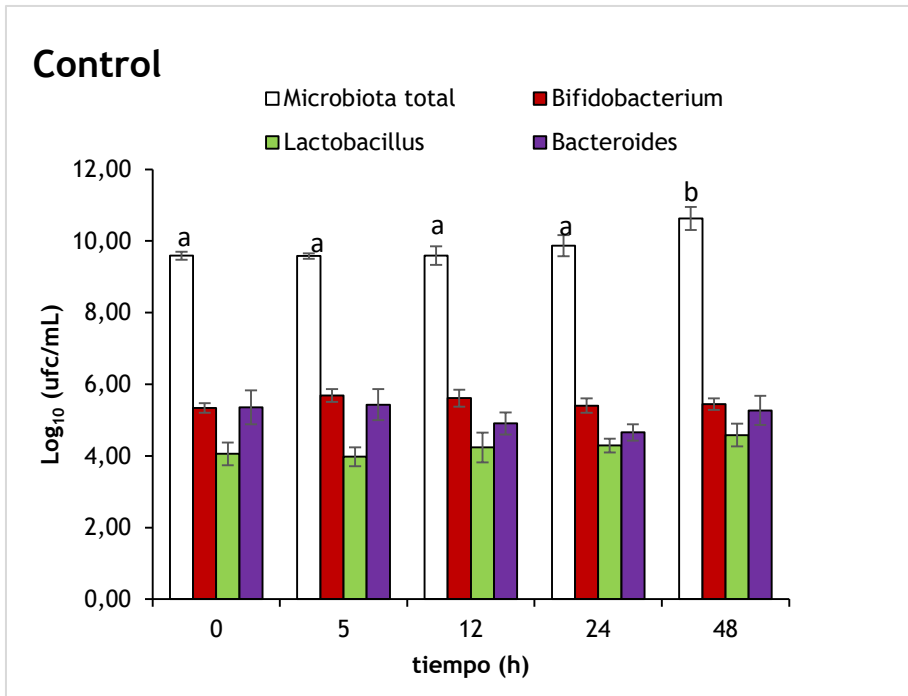


Figura 24. Evolución en los recuentos bacterianos en las fermentaciones de cultivo discontinuo (48 h) en un ensayo de control en presencia de extracto hidrocarbonado genérico. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para cada grupo bacteriano a lo largo del ensayo.

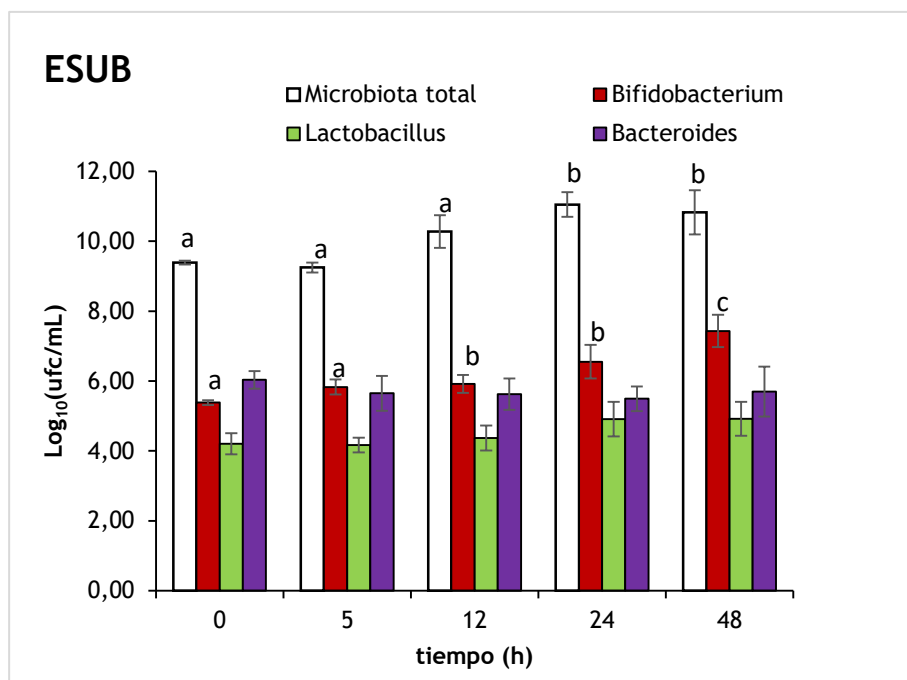


Figura 25. Evolución en los recuentos bacterianos en las fermentaciones de cultivo discontinuo (48 h) en presencia de extracto de uva blanca como fuentes de carbono. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para cada grupo bacteriano a lo largo del ensayo.



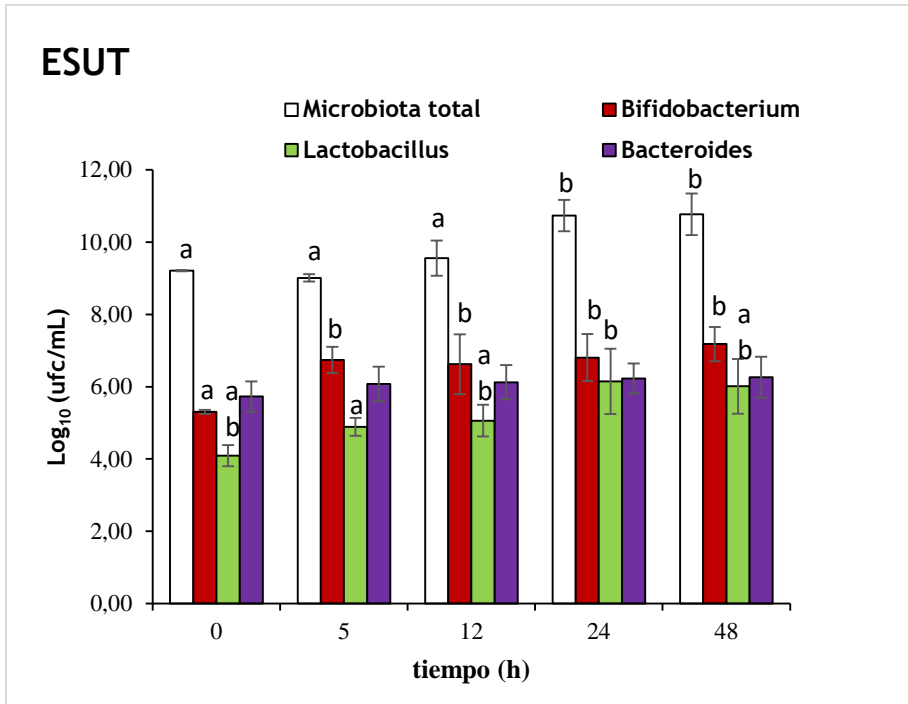


Figura 26. Evolución en los recuentos bacterianos en las fermentaciones de cultivo discontinuo (48 h) en presencia de extracto de uva tinta como fuente de carbono. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para cada grupo bacteriano a lo largo del ensayo.

#### 4.6.1.1. Evaluación del crecimiento de *Bifidobacterium* en ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos

Tal y como se observa en las **Figuras 24-26**, en el caso del ESUB, en los ensayos realizados con los inóculos de los tres voluntarios, el número máximo de *Bifidobacterium* alcanzado fue similar pasando de niveles iniciales de aproximadamente 7 log ufc/g a un máximo de 10 log ufc/g. Sin embargo, dichos valores fueron alcanzados a diferentes tiempos de fermentación en función del voluntario (24 h para el ensayo realizado con el inóculo procedente del voluntario 1 y 48 h para los

ensayos realizados con los inóculos procedentes de los voluntarios 2 y 3). Para los ensayos de fermentación realizados con el ESUT, las concentraciones de *Bifidobacterium* fueron menores que para el caso del ESUB, siendo este extracto más usado por dicha población.

Los tiempos para los cuales se obtuvieron los niveles máximos de fermentación también difirieron. Estos resultados coinciden con los datos de la bibliografía. Así en un estudio, realizado previamente (Barroso y col., 2013), con un extracto de vino tinto a una dosis de 500 mg/mL, se encontró un aumento en la población de *Bifidobacterium*. Dicho aumento fue menos significativo que en el estudio aquí realizado ya que mientras en nuestro caso se obtuvo un aumento de más de 1 log, en dicho estudio solo aumentaron 0,20 logs. En otro estudio realizado (Cueva y col., 2012) con dos fracciones purificadas de extracto de pepita de uva, el primer extracto formado por 70% de monómeros y 28% de compuestos polifenólicos mostró menos crecimiento de *Bifidobacterium* que el segundo extracto, formado por 21% de monómeros y 78% de compuestos polifenólicos, la dosis fue de 600 mg/L. Esto indica que dichos compuestos polifenólicos eran los sustratos principalmente utilizados por las bacterias. Sánchez-Patán y col. (2012) concluyeron que los sustratos utilizados no tenían efecto sobre el crecimiento de *Bifidobacterium*, manteniéndose este género en una concentración constante durante el curso de la fermentación. Monagas y col. (2010) indicaron que la población de *Bifidobacterium* se mantuvo constante en los ensayos de fermentación realizados con 0.6 mg/mL de extracto de uva. Por el contrario, un estudio realizado por Sanchez Patán y col. (2015), en ensayos de fermentación empleando una dosis de 500 mg/L de extracto de semilla de uva, en condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo, mostraron una disminución en la población de *Bifidobacterium* de 2 logs después de 48 horas, lo que indicó la ausencia de efecto bifidogénico. Asimismo, en otro estudio llevado a cabo en un modelo diferente de intestino los resultados no mostraron un aumento en dicha población bacteriana con tres dosis diarias, siendo 1 g/día de polifenoles procedentes del extracto de uva tinta y de zumo de uva, durante dos semanas (Kemperman y col., 2013).

Este diferente resultado en la modulación del género *Bifidobacterium* puede ser debida tanto a la composición del extracto testado como a su concentración y a la concentración inicial de dichas poblaciones antes de entrar en contacto con dichos sustratos. En la mayor parte de estos estudios, los extractos fueron purificados con vistas a evaluar los cambios que se producían únicamente en la porción polifenólica, mientras que en el presente estudio, el residuo evaluado fue todo aquel considerado indigerible a nivel del colon, incluyendo tanto la fibra presente en la piel y semillas de la uva como a la porción polifenólica. Además, la concentración utilizada en este estudio es de 2 g/L y es la que se suele utilizar para los ingredientes prebióticos. En conclusión, los resultados obtenidos para la población de *Bifidobacterium* indicaron una utilización de ambos extractos por parte de la misma, lo que a priori, y a falta de ver los resultados para los otros grupos bacterianos estudiados, parece indicar que dichos sustratos podrían ser bifidogénicos y potencialmente prebióticos.

#### **4.6.1.2. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus* en ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos**

Con respecto a la evolución de *Lactobacillus*, podemos observar que en los ensayos control, no existieron diferencias significativas correspondientes a la concentración de *Lactobacillus*. Por el contrario, los ensayos realizados con los extractos de uva (ESUB y ESUT) mostraron diferencias estadísticamente significativas en el caso del ESUT, mientras no se encontró efecto alguno para el ESUB. En el caso del ESUT, comenzó a notarse un incremento relevante a partir de las 12 horas de fermentación, alcanzando la población máxima a las 24 horas de fermentación. Estos resultados confirman lo expuesto previamente por Cueva y col. (2012) en un estudio realizado con un extracto obtenido de pepitas de uvas tintas a dosis de entre 300 y 450 mg/L y con unas condiciones similares a las llevadas a cabo en este trabajo. Dichos autores notaron un aumento en el crecimiento de *Lactobacillus* hasta las 10 horas de fermentación. Otro estudio realizado con un

extracto de vino a una dosis de 500 mg/L concluyó con efectos positivos en el crecimiento de *Lactobacillus* (Barroso y col., 2013). Por otra parte, Sánchez-Patán y col. (2012) no obtuvo resultados sobre el crecimiento de este grupo bacteriano usando dosis de 600 mg/L de extracto de vino tinto. En un trabajo anterior (Tabasco y col., 2011), dichos autores no solo no encontraron efectos positivos en el crecimiento de *Lactobacillus*, sino que obtuvieron resultados negativos usando extractos de pepita de uva comercial (Vitaflavan®), mostrando de esta manera que eran capaces de inhibir el crecimiento de *Lactobacillus* spp. entre otras bacterias. Yamakoshi y col., (2001) en un estudio *in vivo* mostró un incremento en la población de *Lactobacillus*, mientras que Dolara y col., (2005) en un estudio del mismo tipo realizado en ratas, ha concluido que las ratas alimentadas con polifenoles de vino tinto durante 15 días tenían niveles significativamente más altos de *Lactobacillus* spp. Los resultados obtenidos para la población de lactobacilos indicaron una utilización mayor del extracto de uva tinta que el de uva blanca. La utilización de extractos tanto para este grupo bacteriano como para el anterior parece indicar que dichos sustratos podrían ser lactobacilogénicos.

#### **4.6.1.3. Evaluación del crecimiento de *Bacteroides* en ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos**

Una vez comprobado que hay cambios en el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* cuando se utilizan los ESUT y ESUB como fuente de carbono, se pasó a evaluar los cambios en la población de *Bacteroides*, que es una de las poblaciones mayoritarias en el colon distal en situación normal. Los resultados obtenidos muestra que en el caso del ensayo control la concentración de *Bacteroides* se mantuvo estable. Del mismo modo, en los ensayos en los cuales se les añadió tanto ESUB como ESUT, en ninguno de los casos se mostró una variación estadísticamente significativa en la población de este género bacteriano.

Estos resultados no coinciden totalmente con los obtenidos en estudios anteriores donde, en ensayos de fermentación con extractos polifenólicos del vino y de la uva, se encontraron una disminución en la población de *Bacteroides*. Así, en el estudio llevado a cabo por Sánchez-Patán y col. (2015) con 500 mg/L de extracto de semilla de uva mostró una reducción en la población de *Bacteroides* de 3 logs después de 48 h de fermentación. Barroso y col. (2013) utilizando un extracto de vino a una dosis de 500 mg/L observaron un mantenimiento en la concentración de dicha población bacteriana. Kemperman y col. (2013), tampoco obtuvieron cambios en la concentración de *Bacteroides* durante el tiempo de intervención a una dosis de 1 g de extracto de vino/día durante dos semanas, en un estudio simulando el intestino. Por el contrario, en un estudio realizado por Cueva y col. (2012) bajo condiciones similares a las nuestras, si se encontraron efectos positivos en la concentración de *Bacteroides*, aumentando esta en aproximadamente 0,5 logs a una dosis de 600 mg/L de un extracto procedente de la pepita de la uva, a las 10, 24 y 48 horas de fermentación. Además, otro estudio realizado con extracto de vino tinto a dosis de 600 mg/L también mostró un ligero aumento en la población de este género, alcanzando su máxima concentración a las 10 horas de fermentación (Sánchez-Patán y col., 2012).

#### **4.6.1.4. Evaluación del crecimiento de la microbiota total en ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos**

Una vez observados los cambios producidos en la población de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Bacteroides*, es necesaria la evaluación de la presencia de la microbiota total, para determinar si los cambios producidos son selectivos o no. Al existir un crecimiento positivo tanto en *Bifidobacterium* como en *Lactobacillus*, la microbiota colónica total también debería experimentar este aumento.

Así, en el caso de los ESUB y ESUT se encontraron resultados positivos, experimentando ambos un aumento en la concentración de

microbiota total después de las 24 horas de fermentación. Este aumento puede ser debido no sólo al aumento significativo mostrado anteriormente para las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, sino también a la posibilidad de aumento de otras bacterias no cuantificadas en el presente trabajo. Los resultados obtenidos no coinciden con los obtenidos por otros autores, como Kemperman y col., (2013), que mediante un estudio con un simulador intestinal con un extracto procedente del vino, concluyó que no existía cambio alguno en cuanto a la población de bacterias totales durante el proceso de fermentación. Barroso y col. (2013) tampoco encontraron grandes diferencias en su estudio realizado con extracto de vino, obteniendo una mínima disminución de 0,03 log en la concentración de bacterias totales durante 3 semanas de intervención. Posteriormente Sánchez-Patán y col., (2015), obtuvieron también resultados negativos para la concentración de bacterias totales, disminuyendo la concentración de las mismas en aproximadamente 3 log después de 48 de fermentación.

#### **4.6.1.5. Evaluación del índice prebiótico en ensayos de fermentación *in vitro* con cultivos mixtos**

La medida cuantitativa general del efecto de un sustrato en el crecimiento de la microbiota intestinal, se calculó mediante el índice prebiótico (IP) modificado y propuesto previamente por Palframan y col. (2003). El IP constituye una relación entre los cambios producidos en aquellas bacterias consideradas “beneficiosas” para la salud (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) y las que son consideradas como “perjudiciales” (*Bacteroides* y *Clostridium*) refiriendo dichos cambios a sus niveles iniciales. La ecuación que se empleó fue la siguiente:

$$IP = [(Bif_t/Bif_0) + (Lac_t/Lac_0) - (Bac_t/Bac_0)] / (Rt_t/Rt_0)$$

$Bif_t$  = recuentos de *Bifidobacterium* al tiempo de fermentación

$Bif_0$  = recuentos de *Bifidobacterium* al tiempo inicial 0

$Lac_t$  = recuentos de *Lactobacillus* al tiempo de fermentación

$Lac_0$  = recuentos de *Lactobacillus* al tiempo inicial 0

$Bac_t$  = recuentos de *Bacteroides* al tiempo de fermentación

$Bac_0$  = recuentos de *Bacteroides* al tiempo inicial 0

$Rt_t$  = recuentos totales al tiempo de fermentación

$Rt_0$  = recuentos totales al tiempo inicial 0

Para llevar a cabo este cálculo, y puesto que este índice es un dato que pretende mostrar el efecto global de cada uno de los sustratos sobre la MI, se realizó una media de los valores obtenidos en las poblaciones bacterianas para cada uno de los ensayos realizados con los voluntarios.

Los resultados obtenidos para este índice, en las muestras controles el IP al final de las 48 horas de ensayo mostró valores medios de 0,31, mientras que los ensayos con ESUB mostraron valores claramente superiores, de 4,24, y 4,36 en el caso del ESUT. Por lo tanto, aunque es necesario llevar a cabo un estudio mucho más completo evaluando la modificación de otros grupos bacterianos, los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que los extractos aquí ensayados son capaces de modular de manera selectiva la microbiota intestinal promoviendo el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.







## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes ensayos que comprenden la presente tesis doctoral, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) La MI de la población gallega en estudio presenta algunas diferencias con respecto a lo publicado en otras localizaciones geográficas, como un mayor contenido en Actinobacteria, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y sin embargo, un menor contenido en Proteobacteria. Dentro de la población gallega estudiada, no se encontró influencia del IMC sobre la MI, y si mostraron cierta influencia tanto la edad de los sujetos como su adhesión a la DASE.
- 2) Existen factores específicos dentro de la DASE que podrían estar jugando un papel importante en la prevalencia de algunas enfermedades relacionadas con la alimentación en la población gallega. De este modo, se ha comprobado que en el marco de la DASE se produce una de las mayores ingestas de ácido fitánico del mundo. Esta molécula tiene efectos beneficiosos en la prevención de la diabetes, síndrome metabólico y algunos tipos de cáncer, pero importantes inconvenientes a nivel neurológico.
- 3) La ingesta de antibióticos, aún a los niveles permitidos por la legislación europea como residuos en alimentos, es capaz de modificar a largo plazo la MI. Estos cambios han sido comprobados tanto *in vitro*

como *in vivo*, y en ambos casos, modificaron la MI de manera diferente dependiendo del tipo de antibiótico ingerido.

4) Los extractos polifenólicos procedentes tanto de la uva blanca y como de la uva tinta, mostraron efectos positivos en la MI *in vitro*. Estos efectos consistieron en un incremento selectivo de géneros considerados beneficios como *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*, sin provocar cambios relevantes en otros géneros.





## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Abdou-Donia, M.B., El-Masry, E.M., Abdel-Rahman, A.A., McLendon, R.E., Schiffman, S.S. (2008). Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 21:1415-1429.

Abdou, R.M., Zhu, L., Baker, R.D., Baker, S.S. (2016). Gut microbiota of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61:1268-1281.

Abe, Y., Honsho, M., Nakanishi, H., Taguchi, R., Fujiki, Y. (2014). Very-long-chain polyunsaturated fatty acids accumulate in phosphatidylcholine of fibroblasts from patients with Zellweger syndrome and acyl-CoA oxidase1 deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841:610-619.

Adler, C.J., Dobney, K., Weyrich, L.S., Kaidonis, J., Walker, A.W., Haak, W., Bradshaw, C.J., Townsend, G., Soltysiak, A., Alt, K.W., Parkhill, J., Cooper, A. (2013). Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*, 45:450-455.

Ajslev, T.A., Andersen, C.S., Gamborg, M., Sorensen, T.I.A., Jess, T. (2011). Childhood overweight after establishments of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early

administration of antibiotics. *International Journal of Obesity*, 35:522-529.

Al-Dirbashi, O.Y., Santa, T., Rashed, M.S., Al-Hassnan, Z., Shimosawa, N., Chedrawi, A., Jacob, M., Al-Mokhadab, M. (2008). Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic, and very long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. *Journal of Lipid Research*, 49:1855-1862.

Allen, N.E., Grace, P.B., Ginn, A., Travis, R.C., Roddam, A.W., Appleby, P.N., Key, T. (2008). Phytanic acid: measurement of plasma concentrations by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 99:653-659.

American Association of Cereal Chemists (AACC) (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46:112.

Andersson, D.I., Hughes, D. (2014). Microbiology effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 2014:465-478.

Antonopoulos, D.A., Huse, S.M., Morrison, H.G., Schmidt, T.M., Sogin, M.L., Young, V.B. (2009). Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infection and Immunity*, 77:2367-2375.

Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N., Lázaro-Masedo, S. (2016). Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25-64 años) 2014-2015: estudio ENPE. *Revista Española de Cardiología*, 69:579-587.

Arbolea, S., Sanchez, B., Milani, C., Duranti, S., Solis, G. (2015). Intestinal microbiota development in preterm neonates and effects of perinatal antibiotics. *Journal of Pediatrics*, 166:538-544.



Arboleya, S., Watkins, C., Satnaton, C., Ross, P. (2016). Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Frontiers in Microbiology*, 7:1204.

Argüelles-Arias, F., Rodríguez-Ledo, P., Tenías, J.M., Otero, M., Casellas, F., Blay-Cortés, G., Lucendo, A., Dominguez-Jiménez, J.L., Carballo, F. (2015). Manejo de la intolerancia a la lactosa entre los médicos de atención primaria y su correlación con las de los especialistas en digestivo: encuesta nacional SEPD-SEMG. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107:554-559.

Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One*, 4:e7125

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473:174-180.

Azad, M.B., Bridgman, S.L., Becker, A.B., Kozyrsky, A.L. (2014). Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *International Journal of Obesity*, 38:1290-1298.

Baars, T., Schröder, M., Kusche, D., Vetter, W. (2012). Phytanic acid content and SRR/RRR diastereomer ratio in milk from organic and conventional milk from organic and conventional farms at low and high level of fodder input. *Organic Agriculture*, 2:13-21.

Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307:1915–1920.

Bailey, L.C., Forrest, C.B., Zhang, P., Richards, T.M., Livshits, A., DeRusso, P.A. (2014). Association of antibiotics in infancy with early childhood obesity. *Journal of the American Medical Association Pediatrics*, 168:1063-1069.

Barroso, E., Sanchez-Patan, F., Martin-Alvarez, P.J., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M.V., Pelaez, C., Requena, T., van deWiele, T., Martínez-Cuesta, M.C. (2013). *Lactobacillus plantarum* IFPL935 favors the initial metabolism of red wine polyphenols when added to a colonic microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:10163–10172.

Baynes, R.E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L., Gehring, R., Davis, J., Riviere, J.E. (2016). Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food and Chemical Toxicology*, 88:112-122.

Biesalski, H.K. (2016). Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1372:53-64.

Boleij, A., Tjalsma, H. (2012). Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 87:701-730.

Borukas, A., Moloney, R.D., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2015). Microbiota regulation of the mammalian gut-brain axis. *Advances in Applied Microbiology*, 91:1-62.

Braga, O.C., Campestrini, I., Vieira, I.C., Spinelli, A. (2010). Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical

reduction on a glassy carbon electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21:813-820.

Brown, C.C., Noelle, R.J. (2015). Seeing through the dark: new insights into the immune regulatory functions of vitamin A. *European Journal of Immunology*, 45:1287-1295.

Brown, P.J., Guam, M., Gibberd, F.B., Burston, D., Mayne, P.D., McClinchy, J.E., Sidey, M. (1993). Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 6:295-305.

Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V. (2003). The intestina and its microbiota are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "the intelligent intestine", held in Paris, June 14, 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78:675-683.

Busanello, E.N.B., Viegas, C.M., Moura, A.P., Tonin, A.M., Vargas, C.R., Wajner, M. (2010). In vivo evidence that phytanic acid compromises Na<sup>+</sup>. K<sup>+</sup>-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. *Brain Research*, 1352, 231-238.

Calvo-Malvar, M.M., Leis, R., Benitez-Estévez, A.J., Sánchez-Castro, J., Gude, F. (2016). A randomized, family-focused dietary intervention to evaluate the Atlantic diet: the GALIAT study protocol. *BMC Public Health*, 16:820.

Calza, P., Medana, C., Pazzi, M., Baiocchi, C., Pelizzetti, E. (2004). Photocatalytic transformation of sulfonamides on titanium dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, 53:63-69.

Cani, P., Everard, A. (2016). Talking microbes: when gut bacteria interact with diet and host organs. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60:58-66.

Caporaso, J.G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J. I., Knight, R. (2011) Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, 12:R50.

Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Collins, M., Kolida, S., Rastall, R.A. (2012). In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:2024-2032.

Castro-Penalonga, M., Roca-Saavedra, P., Miranda, J.M., Porto-Arias, J.J., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C.M., Cepeda, A. (2017). Influence of food consumption patterns and Galician lifestyle on human gut microbiota. *Journal of Physiology and Biochemistry*, <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0570-4>.

Cerdó, T., Ruiz, A., Jauregui, R., Azaryah, H., Torres-Espínola, F.J., García-Valdés, L., Segura M.T., Suárez, A., Campoy, C. (2017). Maternal obesity is associated with gut microbial metabolic potential in offspring during infancy. *Journal of Physiology and Biochemistry*. DOI 10.1007/s 13105-017-0577.

Cerniglia, C. E. y Kotarski, S. (1999). Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. *Regulatory, Toxicology and Pharmacology*, 29: 238-261.

Chai, G., Governale, L., McMahon, A.W., Trinidad, J.P., Staffa, J., Murphy, D. (2012). Trends of outpatient prescription drug utilization in US children, 2002-2010. *Pediatrics*, 130:23-31.

Champan, E. (2006).  
<http://www.refsumdisease.org/clinicians/phytanicaidcalculator.shtml>.  
Accessed September 4, 2017.

Chan, Y.K., Estaki, M., Gibson, D.L. (2013). Clinical consequences of diet-induced dysbiosis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63:28-40.

Chaplin, A., Parra, P., Serra, F., Palou, A. (2015). Conjugated linoleic acid supplementation under a high-fat diet modulates stomach protein expression and intestinal microbiota in adult mice. *PLoS One*, 10:e125091.

Chassaing, B., Gewirtz, A.T. (2016). Has provoking microbiota aggression driven the obesity epidemic? *Bioassays*, 38:122-128.

Che, B.N., Kristensen, T., Nebel, C., Dalsgaard, T.K., Hellgren, L.I., Young, J.F., Larsen, M.K. (2013a). Content and distribution of phytanic acid diastereomers in organic milk as affected by feed composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 225-230.

Che, B.N., Oksbjerg, N., Hellgren, L.I., Nielsen, J.H., Young, J.F. (2013b). Phytanic acid stimulates glucose uptake in a model of skeletal muscles, the primary porcine myotubes. *Lipids in Health and Disease*, 12:14.

Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B.A., Zavadi, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teifler, I., Li, H., Alekseyenko, A.V., Blaser, M.J. (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, 488:621-626.

Claesson, M.J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, F., Shanahan,

F., Twomey, C., Fill, C., Ross, R.P., O'Toole, P.W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:4586-4591.

Clemente, J.C., Pehrsson, E.C., Blaser, M.J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., Magris, M., Hidalgo, G., Contreras, M., Noya-Alarcón, O., Lander, O., McDonald, J., Cox, M., Walter, J., Lyk Oh, P., Ruiz, J.F., Rodriguez, S., Shen, N., Jin Song, S., Metcalf, J., Knight, R., Dantas, G., Dominguez-Bello, M.G. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances*, 1:e1500183.

Clemente, J.C., Ursell, L.K., Wegener, Parfrey, L., Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*, 148:1258-1270.

Conlon, M.A., Bird, A.R. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7:17-44.

Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., Gougis, S., Rizkalla, S., Batto, J.M., Renault, P., ARN MicroObes consortium, Doré, J., Zucker, J.D., Clement, K., Ehrlich, S.D., Blottière, H., Leclerc, M., Juste, C., de Wouters, T., Lepage, P., Fougeray, C., Basdevant, A., Henegar, C., Godrad, C., Fondacci, M., Rohia, A., Hajduch, F., Weissenbach, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Gauchi, J.P., Gibrat, J.F., Loux, V., Carré, W., Maguin, E., van den Guchte, M., Jamet, A., Boumezbeur, F., Layec, S. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500:585-588.

Cox, L.M., Blaser, M.J. (2015). Antibiotics in early life and obesity. *Nature Reviews of Endocrinology*, 11:182-190.

Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A.V., Leung, J.M., Cho, I., Kim, S.G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate-Rodriguez, J.G., Rogers, A.B., Robine, N., Loke, P., Blaser, M.J. (2014). Altering

the intestinal microbiota during a critical development window has lasting metabolic consequences. *Cell*, 158:705-721.

Cresci GA, Bawden E (2016) Gut microbiome: What we do and don't know. *Nutrition in Clinical Practice*, 30:734-746.

Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V. (2012). *In vitro* fermentation of grape seed flavan-3ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, 83:792-805.

De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S.P. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record*, 175:325.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107:14691-14696.

Delgado, S., Suárez, A., Mayo, B. (2007). Dominant cultivable *Lactobacillus* species from the feces of healthy adults in northern Spain. *International Microbiology*, 10:141-145.

Demonty, J. (1996). De la penicilline aessor des Blactamines. *Revue Medicale de Liege*, 51:47-49.

Derrien, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 23:354-366.

Dethlefsen, L., Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated

antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:4554-4561.

Devroka, S., Wang, Y., Much, M.W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A., Antonopoulos, D.A., Jabri, B., Chang, E.B. (2012). Dietary- fat-induced taurocholic promotes pathobiont expansion and colitis in II10-/- mice. *Nature*, 487:104-108.

Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A.P., Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591:237-246.

Duggar, B.M. (1948). Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Science*, 51:177–181.

Duncan, S.H., Scott, K.P., Ramsay, A.G., Hermie, J.M. Harmsen, G.W. Welling, G.W., Stewart, C.S., Flint, H.J. (2003). Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:1136–1142.

Economou, V., Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infectious Drug Resistance*, 8:49-61.

Ellekilde, M., Selfjord, E., Larsen, C.S., Jaksevic, M., Rune, I., Tranberg, B., Vogensen, F.K., Nielsen, D.S., Bahl, M.I., Licht, T.R., Hansen, A.K., Hansen C.H.F. (2014). Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Scientific Reports*, 4:5922.



El Kaoutari, A., Armouugom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews in Microbiology*, 11:497-504.

Elmazar, M.M., El-Abhar, H., Schaalan, M.F., Farag, N.A. (2013). Phytol/phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by Docking simulation and modulation of biochemical alterations. *Plos One*, 8:e45638.

Endo, A., Pärtty, A., Kalliomäki, M., Isolauri, E., Salminen, S. (2014). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota from the 2nd week to 13 years of age. *Anaerobe*, 28:149-156 .

Escobar, J.S., Klotz, B., Valdes, B.E., Agudelo, G.M. (2014). The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC Microbiology*, 14:311.

Etteberria, U., Arias, N., Boqué, N., Macarulla, M.T., Portillo, M.P., Martinez, J.A., Milagro, F.I. (2015). Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26:651-660.

Etteberria, U., Castilla-Madrigal, R., Lostao, M.P., Martinez, J.A., Milagro, F.I. (2015). Trans-resveratrol induces a potential anti-lipogenic effect in lipopolysaccharide- stimulated enterocytes. *Cellular and Molecular Biology*, 61:9-16.

European Union (EU) (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 september 2003, on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, L268:29-43.

Faith, J.J., Guruge, J.L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C.,

Leibel, R. L., Rosembaum, M., Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341:1237439.

Fei, N., Zhao, L. (2013). An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The International Society for Microbial Ecology*, 7:880-884.

Fernandez, A.H. (1998). Current views in the USA for the microbiologically active compounds. *Proceedings of the Conference for Global Developments in Risk Assessment of Residues of Veterinary Drugs*, Brussels, Belgium.

Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:4117–4120.

Finlay, A.C., Hobby, G.L., P'an, S.Y., Regna, P.P., Routien, J.B., Seeley, D.B., Shull, G.M., Sobin, B.A., Solomons, I.A., Vinson, J.W., Kane, J.H. (1950). Terramycin, a new antibiotic. *Science*, 11:85

Food and Drug Administration (FDA). (2011). Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. Washington, DC: USA.

Foreyt, R., Kleinman, R., Brown, R.J., Lindstrom, R. (2012). The use of low-calorie sweeteners by children: implications for weight management. *Journal of Nutrition*, 142:S1155-S1162.

Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatellier, E., Sunagawa, S., Pifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdóttir, V., Frogh Pedersen, H., Arumugam, M., Kristiansen, K., Voight, A.Y., Vestergaard, H., Hercog, R., Costea, P.I., Kultima, J.R., Li, J., Jorgensen, T., Levenez, F., Dore, J., MetaHIT consortium, Nielsen, H.B., Brunak, S., Raes, J., Hansen, T., Wang, J., Ehrlich, S.D., Bork,

P., Pedersen, O. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 528:262-266.

Franek, M., Kolar, V., Deng, A. (1999). Determination of sulfadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 11:339-349.

Franfe, E., Neu, H.C. (1987). Tetracyclines. *Medical Clinics of North America*, 3:1221-1236.

Friswell, M.K., Gika, H., Stratford, I.J., Theodoridis, G., Telfer, B., Wilson, I.D., McBain, A.J. (2010). Site and strain-specific variation in gut microbiota profiles and metabolism in experimental mice. *PLoS One*, 5:e8584.

Galley, J.D., Bailey, M., Dush, C.K., Schoppe-Sullivan, S., Christian, L.M. (2014). Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. *PLoS One* 9:e113026.

Garaulet, M., Gómez-Abellán, P. (2013). Chronobiology and obesity. *Nutrición Hospitalaria*, 28:114-120.

Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29:84-91.

Gueimonde, M., Flórez, A.B., van Hoek, A.H., Stuer-Lauridsen, B., Stroman, P., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. (2010). Genetic basis of the tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 3364-3369.

Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4:202

Gibson, M.K., Crofts, T.S., Dantas, G. (2015) Antibiotics and the developing infant gut microbiota and resistome. *Current Opinion in Microbiology*, 27:51-56.

Goodman, L., Gilman, A. (1990). The pharmacological basis of therapeutics. 8 ed. Pergamon. New York; pp. 1158-1175.

Grave, K., Torren-Edo, J., Muller, A., Greko, C., Moulin, G., Mackay, D. (2014). Variations in the sales and sales patterns of veterinary antimicrobial agents in 24 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69:284-2291.

Greenwood, C., Morrow, A.L., Lagomarcino, A.J., Altaye, M., Taft, D.H., Tu, Z., Newburg, D.S., Ward, D.V., Schibler, K.R. (2014). Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of Enterobacter. *Journal of Pediatrics*, 165:23-29.

Greenwood, D. (2003). Sulphonamides. En: Finch, R.G., Greenwood, D., Norrby, S.R., Whitley, R.J., editores. Antibiotic and chemotherapy, 8 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; pp. 385–392.

Griffin, M.O., Fricovsky, E., Ceballos, G., Villareal, F. (2010). Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literatura. *American Journal of Physiology*, 299:C539-548.

Guallar-Castillón, P., Oliveira, A., Lopes, C., López-García, E., Rodríguez-Artalejo, F. (2013), The Southern European Atlantic Diet is associated with lower concentrations of markers of coronary risk. *Atherosclerosis*, 226:502-509.

Guarddon, M., Miranda, J.M., Rodriguez, J.A., Vazquez, B.I., Cepeda, A., Franco, C.M. (2011). Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146:284-289.

Guinane, C.M., Cotter, P.D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6:295-308.

Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., Wang, K. (2008). Development of a realtime PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 47:367-373.

Gupta, S., Allen-Vercoe, E., Petrof, E. (2016). Fecal microbiota transplantation: in perspective. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 9:229-239.

Gutiérrez-Abejón, E., Rejas-Guitérrez, J., Criado-Espiegel, P., Campo-Ortega, E.P., Breñas-Villalón, M.T., Martín-Sobrino, N. (2015). Smoking impact on mortality in Spain in 2012. *Medicina Clínica*, 145:520-525.

Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D., de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:114- 123.

Heim, M., Johnson, J., Boess, F., Bendik, I., Weber, P., Hunziker, W., Fluhmann, B. (2002). Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *FASEB Journal*, 16:718-720.

Hellgren, L.I. (2010). Phytanic acid- and overlooked bioactive fatty acid in dairy fat? *Annals of the New York Academy Science*, 1190:42-49.

Hermann-Bank, M.L., Skovgaard, K., Stockmarr, A., Larsen, N., Molbak, L. (2013). The gut microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genetics*, 14:788- 802.

Herschhorn, A., Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:2717-2747.

Hollister, E., Gao, C., Versalovic, J. (2014). Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*, 146:1449-1458.<sup>[L]<sub>SEP</sub></sup>

Huang, J., Chen, L., Xue, B., Liu, Q., Ou, S., Wang, Y., Peng, X. (2016). Different flavonoids can shape unique but microbiota profile in vitro. *Journal of Food Science*, 81:H2273-H2279.

Huse, S.M., Ye, Y., Zhou, Y., Fodor, A.A. (2012). A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One*, 7:e34242.

Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., Pan, Y., Li, J., Wang, X., Meng, Z., Zhao, F., Liu, D., Ma, J., Qin, N., Xiang, C., Xiao, Y., Li, L., Yang, H., Wang, J., Yang, R., Gao, G.F., Wang, J., Zhu, B. (2013). Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Communications*, 4:2151.

Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., Patterson, P.H., Mazmanian, S.K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155:1451-1463.

Idel, S., Ellinghaus, P., Wolfrum, C., Nofer, J., Gloerich, J., Assmann, G., Spener, F., Seedorf, U. (2002). Branched chain fatty acids induce nitric oxide-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:49319-49325.

Islam, M.T., Oliveira Barros de Alencar, M.V., Conceicao Machado, K.D., Conceição Machado, K.D., Carvalho Melo-Cavalcante, A.A.D., Pergentino de Sousa, D., Mendes de Freitas, R. (2015). Phytol is a pharma-medico-stance. *Chemic-Biological Interactions*, 240:60-73.

Jakobson, H.E., Jerberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLOS One*, 5:e9836.

Jay, M., Ren, J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 3:33–39.

Jeffery, I.B., Claesson, M.J., O'Toole, P.W., Shanahan, F. (2012). Categorization of the gut microbiota: Enterotypes or gradients? *Nature Reviews in Microbiology*, 10:591-592.

Johns, D.J. Hartmann-Boyce, J., Jebb, S.A., Aveyard, P. (2014). Diet or exercise interventions vs combined behavioral weight management programs: a systematic review and meta-analysis of direct comparisons. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114:1557-1568.

Johnson, C.L., Versalovic, J. (2012). The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics*, 129:950-960.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2002). Evaluation of certain veterinary drug residues in food: forty-eighth report of the joint FAO/WHO expert committee on food Additives.

WHO technical report series N° 911. *World Health Organization*. Geneva: Switzerland.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA), (2000). Procedures for recommending maximum residue limits residues of veterinary drugs in food. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Roma: Italy.

Joly, C., Gay-Quéheillard, J., Léké, A., Chardon, K., Delanaud, S., Bach, V., Khorsi-Cauet, H. (2013). Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®) and in the rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 20:2726-2734.

Jones, M.L., Ganopolsky, J.G., Martoni, C.J., Labbé, A., Prakash, S. (2014). Emerging science of the human microbiome. *Gut Microbes*, 5, 446-457.

Jumpertz, R., Le, D.S., Turnbaugh, P.J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon J.I., Krakoff, J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94:58–65.

Jung, S.P., Lee, K.M., Kang, J.H., Yun, S.I., Park, H.O., Moon, Y., Kim, J.Y. (2013). Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on overweight and obese adults: A randomized, double-blind clinical trial. *Korean Journal of Family Medicine*, 34:80-89.

Kahlert, S., Schönfeld, P., Reiser, G. (2005). The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, effects  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiology Disorders*, 18:110-118.

Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome



in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498:99-103.

Kataria, Y., Wright, M., Deaton, R.J., Rueter, E.E., Rybicki, A., Moser, A.B., Ananthanayanan, V., Gann, P.H. (2015). Dietary influences on tissue concentrations of phytanic acid and AMACR expression in the benign human prostate. *The Prostate*, 7:200-210.

Kelly, C.R., de Leon, L., Jasutkar, N. (2012). Fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection in 26 patients: methodology and results. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46:145-149.

Kemperman, R.A., Gross, G., Mondot, S., Possemiers, S., Marzorati, M., Van de Wiele, T., Doré, J., Vaughan, E.E. (2013). Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome. *Food Research International*, 53:659-669.

Khonsari, S., Suganthi, M., Burczynska, B., Dang, V., Choudhury, M., Pachenari, A. (2016). A comparative study of bifidobacteria in human babies and adults. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35:97-103.

Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., Ley, R.E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:4578-4585.

Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT et al (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19:576-585

Komen, J., Distelmaier, F., Koopman, W., Wanders, R., Smeitink, J., Willems, P. (2007). Phytanic acid impairs mitochondrial respiration

through protonophoric action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64:3271-3281.

Korpela, K., de Vos, W.M. (2016). Antibiotic use in childhood alters the gut microbiota and predisposes to overweight. *Microbial Cell*, 7:296-298.

Laniro, G., Tilg, H., Gasbarrini, A. (2016). Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*, 65:1906-1915.

Lay, C., Sutren, M., Rochet, V., Saunier, K., Doré, J., Rigottier-Gois, L. (2005). Design and validation of 16S rDNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environmental Microbiology*, 7:933-946.

Layton, A., MacKay, L., Willians, D., Garret, V., Gentry, R., Saylor, G. (2006). Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:4214-4224.

Le Chatellier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.M.; Kennedy, S.; Leonard, P.; Li, J.; Burgdorf, K.; Grarup, N.; Jorgensen, T.; Brandslund, I.; Nielsen, H.B.; Juncker, A.S.; Bertalan, M.; Levenez, F.; Pons, N.; Rasmussen, S.; Sunagawa, S.; Tap, J.; Tims, S.; Zoetendal, E.G.; Brunak, S.; Clement, K.; Doré, J.; Kleerebezem, M.; Kristiansen, K.; Renault, P.; Sicheritz-Ponten, T.; de Vos, W.M.; Zucker, J.D.; Raes, J.; Hansen, T.; MetaHIT consortium, Bork, P.; Wang, J.; Ehrlich, S.D.; Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500:541-546.

Leclercq, S., Mian, F.M., Stanisz, A.M., Bindels, L.B., Cambier, E., Ben-Amaram, H., Forsythe, P., Bienestock, J. (2017). Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut

microbiota, brain cytokines and behavior. *Nature Communications*, 8:15062.

Lecomte, V., Kaakoush, N.O., Maloney, C.A., Raipuria, M., Huinao, K.D., Mitchell, H.M., Morris, M.J. (2015). Changes in gut microbiota in rats fed a high diet correlate with obesity parameters. *PLoS One*, 10:e0126931.

Lee, C.Y. (2013). Challenges in providing credible scientific evidence of health benefits of dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 5:524-526.

Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H.R., Scheeder, M.R.L. (2005). A study on the causes for the elevated *n*-3 fatty acids in cow's milk of alpine origin. *Lipids*, 40:191-202.

Leipnitz, G., Amaral, A.U., Zanatta, A., Seminotti, B., Fernandes, C.G., Knebel, L.A., Vargas, C.R., Wajner, M. (2010). Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. *Life Sciences*, 87:275-280.

Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. *Boletín Oficial del Estado*, 298, 43088-43099.

Ley, R.E., Bäcker, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbiota ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31):11070-11075.

Ley, R.E., Turnbaugh, P., Klein, S., Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122):1022-1023.

Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del medicamento. *Boletín Oficial del Estado*, 3065:38228-38246.

Ley 29/2006, de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. *Boletín Oficial del Estado*, 178:62935-63030.

Li, H., Jia, W. (2012). Cometabolism of microbes and host: implications for drug metabolism and drug-induced toxicity. *Clinical Pharmacology & Therapy*, 94:574-581.

Li, M., Li, G., Shang, Q., Chen, X., Liu, X., Pi, X., Zhu, L., Yin, Y., Yu, G., Wang, X. (2016). In vitro fermentation of alginate and its derivatives by human gut microbiota. *Anaerobe*, 39:19-25.

Liska, J., Macejova, S., Ondkova, J., Brtko, J. (2012). Morphology of 1-methyl-1-nitrosourea induced rat mammary tumors alters treatment with precursor of phytanic acid and its combination with vitamin D analogue. *Endocrine Regulations*, 46:21–26.

Li, Z., Henning, S.M., Lee, R.P., Lu, Q.Y., Summanen, P.H., Thames, G., Corbett, K., Downes, J., Tseng, C.H., Finegold, S.M., Heber, D. (2015). Pomegranate extract induces metabolite formation and changes stool microbiota in healthy volunteers. *Food & Function*, 6:1487-1495.

Luoto, R., Kalliomäki, M., Laitinen, K., Isolauri, E. (2010). The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *International Journal of Obesity*, 34:1531-1537.

Lucquin, A., Colonese, A., Farrell, T.F.G., Craig, O.E. (2016). Utilising phytanic acid diastereomers for the characterisation of archaeological lipid residues in pottery samples. *Tetrahedron Letters*, 57:703-707.

Macfarlane, G. T., Macfarlane, S., & Gibson, G. R. (1998). Validation of a three-stage compound continuous culture system for

investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35, 180-187.

Machado, M.V., Cortez-Pinto, H. (2012). Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 11:440-449.

Manichahn, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., Guigo, R., Knight, R., Guarner, F. (2010). Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Research*, 20:1411-1419.

Martin, F.P.J., Montoliu, I., Nagy, K., Moco, S., Collino, S., Guy, P., Redeuil, K., Scherer, M., Rezzi, S., Kochhar, S. (2012). Specific dietary preferences are linked to differing gut microbial metabolic activity in response to dark chocolate intake. *Journal of Proteome Research*, 11:6252-6263.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., Tanaka, R. (2004). Use of 16S rRNA gene targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7220-7228.

McCarty, M. F. (2001). The chlorophyll metabolite phytanic acid is a naturalrexinoid – Potential for treatment and prevention of diabetes. *Medical Hypotheses*, 56:217–219.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) (2015). Informe del consumo de alimentación en España 2015. Disponible en: [http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015\\_tcm7-422694.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf). Consultado el 09.01.2017.

Mikkelsen, K.H., Allin, K.H., Knop, F.K. (2016) Effect of antibiotics on gut microbiota, glucose metabolism and body weight

regulation: a review of the literature. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18:444-453.

Mikkelsen, K.H., Knop, F.K., Frost, M., Hallas, J., Pottegard, A. (2015). Use of antibiotics and risk of type 2 diabetes: A population-based case-control study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100:3633-3640.

Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Fente, C.A., Barros-Velazquez, J., Cepeda, A., Franco, C.M. (2008). Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poultry Science*, 87:1643-1648.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andrés-Lacueva, C., Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1:233–253.

Mönnig, G., Wiekowski, J., Kirchhof, P., Stypmann, J., Plenz, G., Fabritz, L., Bruns, H.J., Eckardt, L., Assmann, G., Haverkamp, W., Breithardt, G., Seedorf, U. (2004). Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 15, 1310-1316.

Morgan, X.C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shan, S. A., LeLeiko, L., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, 13:R79.

Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucet-Populaire, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55:38-44.

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262:56-61.

Murphy, E.F., Clarke, S.F., Marques, T.M., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P., O'Doherty, R.M., Shanahan, F., Cotter, P.D. (2013). Strategies for targeting obesity and metabolic health? *Gut Microbiota*, 4:48-51.

Murphy, R., Stewart, A.W., Braithwaite, I., Beasley, R., Hancox, R.J., Mitchell, E.A., ISAAC Phase Three Study Group. (2014). Antibiotic treatment during infancy and increased body mass index in boys: an international cross-sectional study. *International Journal of Obesity*, 38:1115–1119.

Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, J.M., Tinahones, F.J., Cardona, F., Soriguer, F., Queipo-Ortuño, M.I. (2013). Gut microbiota in children with type I diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Medicine*, 11:46-57.

Nagai, K. (2015). Phytanic acid induces Neuro2a cell death via histone deacetylase activation and mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology and Teratology*, 48:33-39.

Nakanishi, T., Anraku, M., Suzuki, R., Kono, T., Erickson, L., Kawahara, S. (2016). Novel immunomodulatory effects of phytanic acid and its related substances in mice. *Journal of Functional Foods*, 21:283–289.

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395:559-579.

Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. (2015). How informative if the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*, 8, 1-16.

Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336:1262-1267.

Nobel, Y.R., Cox, L.M., Kirigin, F.F., Bokulich, N.A., Yamanishi, S., Teitler, I., Chung, J., Sohn, J., Barber, C.M., Goldfarb, D.S., Raju, K., Abubucker, S., Zhou, Y., Ruiz, V.E., Li, H., Mitreva, M., Alekseyenko, A.V., Weinstock, G.M., Sodergren, E., Blaser, M.J. (2015). Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nature Communications*, 6:7486.

Okubo, H., Sakoda, H., Kushiya, A., Fujishiro, M., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Matsunaga, Y., Kamata, H., Asahara, T., Yoshida, Y., Chonan, O., Iwashita, M., Hishimura, F., Asano, T. (2013). *Lactobacillus casei* strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis developments in a rodent model. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305:G911-G918.

Oliveira, A., Lopez, C., Rodríguez-Artalejo, F. (2010). Adherence to the Southern European Atlantic Diet and occurrence of nonfatal acute myocardial infarction. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92:211-217.

Ollberding, N.J., Aschebrook-Kilfoy, B., Caces, D.B.D., Wright, M.E., Weisenburger, D.D., Smith, S.M., Chiu, B.C.H. (2013). Phytanic acid and the risk of non-Hodkin lymphoma. *Carcinogenesis*, 34:170-175.

Orden de 11 de Julio de 2007 por la que se clasifica de interés sanitario la Fundación Dieta Atlántica. *Diario Oficial de Galicia*, 140:12469.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>). Consultado el 5 de Mayo de 2017.



Ozdal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8:78.

Palframan, R., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37:281-284.

Palmnäs, M.S., Cowan, T.E., Bomhof, M.R., Su, J., Reimer, R.A., Vogel, H.J., Hittel, D.S., Shearer, J. (2014). Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rats. *PLoS One*, 9:e109841.

Panda, S., El Khader, I., Casellas, F., Lopez Vivancos, J., García Cors, M., Santiago, A., Cuenca, S., Guarner, F., Manichanh, C. (2014). Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One*, 9:e95476.

Penders, J., Stobberingh, E.E., Savelkoul, P.H.M., Wolffs, P.F.G. (2013). The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4:87.

McNally, R. (1994). Penicillins systemic. E: US Pharmacopeial Inc. Drug Information for the Health Care Professional. USP DI 14 ed. Massachusetts:1: pp. 751-77.

Pepino, M.Y. (2015). Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiology and Behavior*, 152:450-455.

Pérez-Farinós, N., López-Sobaler, A.M., Dal Re, A., Villar, C., Labrado, E., Robledo, T., Ortega, R. (2013). The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. *Biomed Research International*, 2013:163687

Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55:856-866.

Philips, M.L. (2009). Gut reaction: environmental effects on the human microbiota. *Environmental Health Perspectives*, 117(5):A198-A205.

Poutahidis, T., Springer, A., Levkovich, T., Qi, P., Varian, B.J., Lakritz, J.R., Ibrahim, Y.M., Chatzigiagkos, A., Alm, E.J., Erdman, S.E. (2014). Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. *PLoS One*, 9:e84877.

Power, S.E., O'Toole, P.W., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, 111:387-402.

Price, A.J., Allen, N.E., Appleby, P.N., Crowe, F.L., Jenab, M., Rinaldi, S., Slimani, N., Kaaks, R., Rohrmann, S., Boeing, H., Pischon, T., Benetou, V., Naska, A., Trichopoulou, A., Palli, D., Sieri, S., Tumino, R., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H.B., Donate, I., González, C.A., Sánchez, M.J., Chirlaque, M.D., Ardanaz, E., Larrañaga, N., Khaw, K.T., Rodwell, S., Gallo, V., Michaud, D.S., Riboli, E., Key, T.J. (2010). Plasma phytanic acid concentration and risk of prostate cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91:1769-1776.

Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Tang, X., Shi, Y., Le, G. (2014). Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food & Function*, 5:1241-1249.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linnenderg, A., Nielsen, B., Pelletier, E., Renault, P.,

Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D., Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464:59-65.

Quin, N., Yang, F., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., Guo, J., Le Chatellier, E., Yao, J., Wu, L., Zhou, J., Ni, S., Liu, L., Pons, N., Batto, J.M., Kennedy, S.P., Leonard, P., Yuan, C., Ding, W., Chen, Y., Hu, X., Zheng, B., Qian, G., Xu, W., Enrlich, S.D., Zheng, S., Li, S. (2014). Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*, 513:59-64.

Rajilic-Stojanovic, M., Heiling, H.G.H., Tims, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M. (2012). Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental Microbiology*, 15:1146-1159.

Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., Neuzil, J., Moreno-Sánchez, R. (2010). Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. *Molecular Aspects of Medicine*, 31:29-59.

Rao, M.H.R., Arunkumar, L.C., Sambasivarao, K.R.S. (2011). Qualitative and qualitative analysis of ampicillin in milk and dairy products. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 1:186-191.

Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. *Boletín Oficial del Estado*, 53:7353-7409.

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34:11370-11421.

Reed, S.H., Neuman, S., Moscovich, S., Glahn, R.P., Koren, O., Tako, E. (2015) Chronic zinc deficiency alters chick gut microbiota composition and function. *Nutrients*, 7:9768-9784.

Reglamento (CE) N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L268:29-43.

Reglamento (CE) N° 2377/90 del consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L224:1-8.

Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L15:1-72.

Reiser, G., Schönfeld, P., Kahlert, S. (2006). Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. *International Journal of Development Neuroscience*, 24:113-122.

Renner, L., Kersten, S., Duevel, A., Schuberth, H. J., Dänicke, S. (2013). Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid, linoleic acid, phytanic acid and the combination of various fatty acids on proliferation and cytokine expression of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Nutrients*, 5:2667-2683.

Riley, L.W., Raphael, E., Faerstein, E. (2013). Obesity in the United States- dysbiosis from exposure to low-dosage antibiotics? *Frontiers in Public Health*, 69:1-8.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzi, B., Szajewska, H., Stahi, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P., Neyrinck, A.M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104:S1–S3.

Roberts, C.L., Keita, A.V., Duncan, S.H., O’Kennedy, N., Söderholm, J.D., Rhodes, J.M., Campbell, B.J. (2010). Translocation of Crohn’s disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*, 59:1331-1339.

Roca-Saavedra, P., Mariño-Lorenzo, P., Miranda, J.M., Porto-Arias, J.J., Lamas, A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A. (2017a). Phytanic acid consumption and human health, risks, benefits and future trends: a review. *Food Chemistry*, 21:237-247.

Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabril, M., Miranda, J.M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C.M., Cepeda, A. (2017b). Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota- a review. *Journal of Physiology and Biochemistry*, DOI: 10.1007/s13105-017-0564-2.

Ronicke, S., Krusta, N., Kahlert, S., Reiser, G. (2009). The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acids and Refsum disease-associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neurobiology Diseases*, 36:401-410.

Ruiz Alvarez, V., Puig Peña, Y. (2012). Rodríguez Acosta, M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana de Investigación Biomedica*, 1:1-29.

Russell, S.L., Gold, M.J., Hartmann, M., Willing, B.P., Thorson, L., Wlodarska, M.; Gill, N.; Blanchet, M.R.; Mohn, W.W.; McNagny, K.M., Finlay, B.B. (2012). Early life antibiotic-driven changes in

microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Reports*, 13:440-447.

Russell, S.L., Gold, M.J., Reynolds, L.A., Willing, B.P., Dimitriu, P., Thorson, L., Redpath, S.A., Perona-Wright, G., Blanchet, M.R., Mohn, W.W., Finlay, B.B., McNagny, K.M. (2015). Perinatal antibiotic-induced shifts in gut microbiota have differential effects on inflammatory lung diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135:100-109.

Saad, R., Rizkallah, M.R., Aziz, R.K. (2012). Gut pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex, interactions between drugs and gut-associated microbes. *Gut Pathogens*, 4:16-28.

Sánchez, M., Darimont, C., Drapeau, V., Emady-Azar, S., Lepage, M., Rezzonico, E., Ngom-Bru, C., Berger, B., Philippe, L., Ammon-Zuffrey, C., Leone, P., Chevrier, G., St-Amand, E., Marette, A., Doré, J., Tremblay, A. (2014). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *British Journal of Nutrition*, 111:1507-1519.

Sánchez-Patán, F., Barroso, E., van de Wiele, T., Jiménez-Girón, A., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Martínez-Cuesta, M., Peláez, C., Requena, T., Bartolomé, B. (2015). Comparative *in vitro* fermentations of cranberry and grape seed polyphenols with colonic microbiota. *Food Chemistry*, 183:273-282.

Sánchez-Patán, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Quintanilla-López, J.E., Lebron-Aguilar, R., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B. (2012). *In vitro* fermentation of a red wine extract by human gut microbiota: changes in microbial groups and formation of phenolic metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:2136-2147.

Saulnier, D.M., Spinler, J.K., Gibson, G.R., Versalovic, J. (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:135–141.

Schönfeld, P., Kahlert, S., Reiser, G. (2004). In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochemical Journal*, 383:121-128.

Schröder, M., Lutz, N.L., Tangwan, E.C., Hajazimi, E., Vetter, W. (2012). Phytanic acid concentrations and diastereomer ratios in milk fat during changes in the cow's feed from concentrate to hay and back. *European Food Research and Technology*, 234:955-962.

Schröder, M., Lutz, N.L., Vetter, W. (2014). GC/MS and <sup>1</sup>H-NMR analysis of phytanic acid synthesized from natural *trans*-phytol and a synthetic phytol standard. *Chromatographia*, 77:379-385.

Schröder, M., Vetter, W. (2011). GC/EI-MS determination of the diastereomer distribution of phytanic acid in food samples. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88:341-349.

Schippa, S., Conte, M.P. (2014). Dysbiotic events in gut microbiota: Impacts on human health. *Nutrients*, 6:5786-5805.

Schlüter, A., Barberá, M.J., Iglesias, R., Giralt, M., Villarroya, F. (2002a). Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochemical Journal*, 15:61-69.

Schlüter, A., Yubero, P., Iglesias, R., Giralt, M., Villarroya, F. (2002b). The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *International Journal of Obesity*, 26:1277-1280.

Selkälä, E.M., Nair, R.R., Schmitz, W., Kvist, A.P., Baes, M., Hiltunen, J.K., Autio, K.J. (2015). Phytol is lethal for Amacr-deficient mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851:1394-1405.

Shankar, P., Ahuja, S., Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*, 29:1293-1299.

Singh, V., Yeon, B.S., Vijay-Kumar, M. (2016). Gut microbiome as a novel cardiovascular therapeutic target. *Current Opinion in Pharmacology*, 27:8-12.

Skold, O. (2000). Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3:155-160.

Spanish Society of Community Nutrition (SENC) (2011) Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria 2011. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 17:178-199.

Stephens, C.R., Conover, L.H., Hochstein, F.A., Regna, P.P., Pilgrim, F.J., Brunings, K.J., Woodward, R.B. (1952). Terramycin. VIII. Structure of aureomycin and terramycin. *Journal of the American Chemist's Society*, 74:4976-4977.

Swithers, S.E., Martin, A.A., Clark, K.M., Laboy, A.F., Davidson, T.L. (2010). Body weight gain in rats consuming sweetened liquids. Effects on caffeine and diet composition. *Appetite*, 55:528-533.

Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., Peláez, C., Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 28:1345- 1352.

Tang, X. H., Suh, M. J., Li, R., Gudas, L. J. (2007). Cell proliferation inhibition and alterations in retinol esterification induced



by phytanic acid and docosahexaenoic acid. *Journal of Lipid Research*, 48:165-176

Tan, H., O'Toole, P.W. (2015). Impact of diet on the human intestinal microbiota. *Current Opinion on Food Science*, 2:71-77.

.Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81:1-10.

Ternak, G. (2005). Antibiotics may act as growth/obesity promoters in humans as an inadvertent result of antibiotic pollution? *Medical Hypotheses*, 64:14-16.

Thapa, D., Louis, P., Losa, R., Zweifel, B., Wallace, R.J. (2015). Essential oils have different effects on human pathogenic and commensal bacteria in mixed faecal fermentations compared with pure cultures. *Microbiology*, 161:441-449.

The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486:207-214.

Thomas, R.M., Jobin, C. (2016). The microbiome and cancer: Is the “oncobiome” mirage real? *Trends in Cancer*, 1:24-35.

Tilg, H., Kaser, A. (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6):2126-2132.

Tojo, R., Leis, R. (2009). La Dieta Atlántica, el pescado y las algas- su importancia en el neurodesarrollo y la función cerebral. En: Fundación Dieta Atlántica and Universidade de Santiago de Compostela (Capítulo: El papel de la Dieta Atlántica como contrapunto saludable a la Dieta Occidental actual, pp 23-28).

Tojo Sierra R., Leis Trabazo R. (2008). Obxectivos de saúde nutricional nos comedores universitarios na USC: Dieta Atlántica. Guía de elaboración dunha dieta saudable nos comedores universitarios da USC. Vicerreitoría de Comunidade Universitaria e Compromiso Social.

Tojo Sierra R., Leis Trabazo R. (2007). La obesidad en la infancia y en la adolescencia. En: Nutrición, Actividad física y Prevención de la Obesidad. Estrategia NAOS. Ministerio de Sanidad y Consumo. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Madrid. Ed. Médica Panamericana.

Trasandre, L., Blustein, J., Liu, M., Corwin, E., Cox, L.M. (2013). Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International Journal of Obesity*, 37:16-23.

Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*, 1:6ra14.

Van den Brink, D.M., Wanders, R.J.A. (2006). Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cellular and Molecular Life Science*, 63:1752-1765.

Van Vleck Pereira, R., Lima, S., Siler, J.D., Foditsch, C., Wamick, L.D., Carvalho Bicalho, R. (2016). Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: Longitudinal effects on fecal microbiota composition in preweaned calves. *PloS One*, 11:e0147525.

Varian, B.J., Poutahidis, T., Levkovich, T., Ibrahim, Y.M., Lakritz, J.R., Chatzigiagkos, A., Scherer-Hoock, A., Alm, E.J., Erdman, S.E. (2014). Beneficial bacteria stimulate youthful thyroid gland activity. *Obesity and Weight Loss Therapy*, 4:220.

Vaz Velho, M., Pinheiro, R., Rodriguez, A.S. (2016). The Atlantic Diet-origin and features. *International Journal of Food Studies*, 5:106-119.

Verhoeven, N.M., Jacobs, C. (2001). Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Progress in Lipid Research*, 40:453-466.

Vetter, W., Schröder, M. (2010). Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in organic than in conventional dairy products from the German market. *Food Chemistry*, 119:746-752.

Vetter, W., Schröder, M. (2011). Phytanic acid- a tetramethyl-branched fatty acid in food. *Lipid Technology*, 23:175-178.

Vetter, W., Schröder, M., Lehnert, K. (2012). Differentiation of refined and virgin edible oils by means of the trans- and cis-phytol isomer distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:6103-6107.

Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L. (2014). Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5:494.

Vrieze, A., Out, C., Fuentes, S., Jonker, L., Reuling, I., Kotte, R.S., van Nood, E., Holleman, F., Knaapen, M., Romjin, J.A., Soeters, M.R., Blaak, E.E., Dallinga-Thie, G.M., Reijnders, D., Ackermans, M.T., Serlie, M.J., Knop, F.K., Holst, J.J., van der ley, C., Kema, I.P., Zoentendal, E.G., de Vos, W.M., Hoekstra, J.B., Strees, E.S., Groen, A.K., Nieuwdorp, M. (2014). Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of Hepatology*, 60:824-831.

Wagner, R.D., Shemedia, J.J., Cerniglia, C.E. (2008). In Vitro model of colonization resistance by the enteric microbiota: Effects of

antimicrobial agents used in food-producing animals *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52:1230-1237.

Wallace, T.C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M.D., Gibson, G., Hentges, E., Sanders, M.E. (2011). Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*, 69:392-403.

Walsh, P.C. (2005). Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. *Journal of Urology*, 174:1824.

Wanders, R.J.A., Komen, J., Ferdinandusse, S. (2011). Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811:498-507.

Werner, L.B., Hellgren, L.I., Raff, M., Jensen, S.K., Petersen, R.A., Drachmann, T., Tholstrup, T. (2011). Effect of dairy fat on plasma phytanic acid in healthy volunteers- a randomized controlled trial. *Lipids in Health and Disease*, 10:95.

Wierzbicki, A.S. (2007). Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha- oxidation: a review. *Biochemical Society Transactions*, 35:881-886.

Wright, M.E., Bowen, P., Virtamo, J., Albanes, D., Gann, P.H. (2012). Estimated phytanic acid intake and prostate cancer risk: a prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 131:1396-1406.

Wu, H., Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2015). Linking microbiota to human diseases: A systems biology perspective. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26:758-770.

Wu, J., Cohen, P., Spiegelman, B. M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes & Development*, 27:234-250.

Xu, J., Thornburg, T., Turner, A.R., Vitolins, M., Case, D., Shadle, J., Hinson, L., Sun, J. Liu, W., Chang, B., Adams, T.S., Zheng, S.L., Torti, F.M. (2005). Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. *Prostate*, 63:209-214.

Yamakoshi, J., Tokutake, S., Kikuchi, M., Kubota, Y., Konishi, H., Mitsuoka T. (2001). Effect of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on human fecal flora and fecal odor. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13:25-31.

Yap, P.S.X., Lim, S.H.E., Hu, C.P., Yiap, B.C. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, 20:710-713.

Yepuri, N.R., Holt, S.A., Moraes, G., Holden, P.J., Hossain, K.R., Valenzuela, S.M., James, M., Darwish, T.A. (2014). Stereoselective synthesis of perdeuterated phytanic acid, its phospholipid derivatives and their formation into lipid model membranes for neutron reflectivity studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 183:22-33.

Yun, J.Y., Yan, P.S. (2015). Fatty acid composition evaluation of edible parts of *Eriocheir sinensis* in intensive ponds of Gucheng waters. *Genetics and Molecular Research*, 14:5334–5345.

Zomer, A.W. (2000). Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor plasma. *Journal of Lipid Research*, 41:1801-1807.





## **ANEXOS**





## Influence of food consumption patterns and Galician lifestyle on human gut microbiota

Maria Castro-Penabazaga<sup>1</sup> · Paula Roca-Saavedra<sup>1</sup> · Jose Manuel Miranda<sup>1,2</sup> ·  
Jose Julio Porto-Arias<sup>1</sup> · Carolina Nebot<sup>1</sup> · Alejandra Cardelle-Cobas<sup>1</sup> ·  
Carlos Manuel Franco<sup>1</sup> · Alberto Cepeda<sup>1</sup>

Received: 13 January 2017 / Accepted: 2 June 2017  
© University of Navarra 2017

**Abstract** The proportion of different microbial populations in the human gut is an important factor that in recent years has been linked to obesity and numerous metabolic diseases. Because there are many factors that can affect the composition of human gut microbiota, it is of interest to have information about what is the composition of the gut microbiota in different populations in order to better understand the possibilities for improving nutritional management. A group of 31 volunteers were selected according to established inclusion and exclusion criteria and were asked about their diet history, lifestyle patterns, and adherence to the Southern European Atlantic Diet. Fecal samples were taken and subsequently analyzed by real-time PCR. The results indicated different dietary patterns for subjects who consumed a higher amount of fruits, vegetables, legumes, and fish and a lower amount of bakery foods and pre-cooked foods and snacks compared to Spanish consumption data. Most participants showed intermediate or high adherence to Southern European Atlantic Diet and an analysis of gut microbiota showed high numbers of total bacteria and Actinobacteria, as well as high amounts of bacteria belonging to the genera *Lactococcus* spp. and *Bifidobacterium* spp. A

subsequent statistical comparison also revealed differences in gut microbiota depending on the subject's body weight, age, or degree of adherence to the Southern European Atlantic Diet.

**Keywords** Gut microbiota · Actinobacteria ·  
*Bifidobacterium* · *Lactococcus* · Atlantic Diet · Southern  
European Atlantic Diet

### Introduction

The Atlantic Diet (AD) is a dietary pattern characterized by a high consumption of seafood, derived from the major importance of the fishing industry in the Atlantic region [26]. Furthermore, red meat and dairy products are staple foods as a result of the high rainfall in the region and the abundance of good pastures that favor extensive cattle breeding [10, 22]. The meat/fish intake consumption in the AD is near to neutral and the AD is also characterized by a high intake of vegetables and legumes, soups, potatoes, and whole grain bread [22, 34]. The sauces used are low in calories, but high in nutritional quality. Olive oil is used as a dressing and for cooking, and eggs and wine consumption are moderate [7]. The AD is also characterized by a high intake of seasonal foods that are locally fresh and minimally processed and original food recipes that are simple but carefully prepared [22, 34]. With respect to cooking methods, foods are commonly steamed, boiled, baked, grilled, or stewed rather than fried [7]. The type of food associated with the traditional AD of Galicia has been stated in the AD pyramid [13].

There are variations in the dietary patterns of AD because the AD region includes large countries with very different climatology, such as Portugal, Ireland, the United Kingdom, Belgium, the Netherlands, Denmark, Norway, Iceland, and part of Spain and France [14]. Among these countries, Portugal and Galicia (northwestern Spain) are geographically,

This article forms part of a special issue of the *Journal of Physiology and Biochemistry* entitled "Impact of lifestyle patterns on human health: integral approach from the child to the elderly".

✉ Jose Manuel Miranda  
josemanuel.miranda@unizar.es

<sup>1</sup> Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

<sup>2</sup> Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Edificio 4p.b, Campus Universitario, 27002 Lugo, Spain





## Review

## Phytanic acid consumption and human health, risks, benefits and future trends: A review



P. Roca-Saavedra, P. Mariño-Lorenzo, J.M. Miranda \*, J.J. Porto-Arias, A. Lamas, B.I. Vazquez, C.M. Franco, A. Cepeda

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Pabellón 4, Pazo de Lugo, 27002 Lugo, Spain

## ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 14 July 2016  
Received in revised form 29 September 2016  
Accepted 18 October 2016  
Available online 18 October 2016

**Chemical compounds studied in this article:**  
Adenosine triphosphatase (PubChem CID: 5957)

Chlorophyll *a* (PubChem CID: 12085802)

Chlorophyll *b* (PubChem CID: 11583175)

Chlorophyll *d* (PubChem CID: 16070025)

Dihydroxyphenyl (PubChem CID: 103459)

Docosahexaenoic acid (PubChem CID: 445580)

Glucose (PubChem CID: 5793)

Nitrogen oxide (PubChem CID: 945)

Phytanil (PubChem CID: 5295819)

Phytanic acid (PubChem CID: 26940)

Phytol (PubChem CID: 5280405)

Pristanal (PubChem CID: 14071060)

Pristanic acid (PubChem CID: 123829)

Stearic acid (PubChem CID: 444795)

**Keywords:**

Phytanic acid  
Pristanic acid  
Phytol  
Behcet disease  
Peroxidomal disordern  
Organic milk  
Aerobic diet  
Southern Atlantic Diet

## ABSTRACT

Phytanic acid is a methyl-branched fatty acid present in the human diet, derived from the enzymatic degradation of phytol and subsequently oxidized by the ruminal microbiota and certain marine organisms. Consequently, phytanic acid is carried into the human body by means of food ingestion, mainly via red meat, dairy products and fatty marine foods. This fatty acid accumulates in people with some peroxisomal disorders and is traditionally related to neurological damage. However, some benefits derived from phytanic acid intake have also been described, such as the prevention of metabolic syndrome or type 2 diabetes. The aim of this work was to conduct an overview of the literature on the phytanic acid content of foods, management of the phytanic content during food production and biochemical mechanisms of phytanic acid metabolism, as well as to assess the evidence for the health benefits and risks of phytanic acid consumption in human health.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction	238
2. Phytol degradation pathway and synthesis of phytanic acid	238
3. Food sources of phytanic acid	239
4. Managing the phytanic acid content in food production	240

\* Corresponding author at: Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Pabellón 4 p.b., Campus Universitario, 27002 Lugo, Spain.  
E-mail address: [josemanuel.miranda@usc.es](mailto:josemanuel.miranda@usc.es) (J.M. Miranda).





## Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota—a review

Paula Roca-Saavedra<sup>1</sup> · Veronica Méndez-Vilahrille<sup>1</sup> · José Manuel Miranda<sup>1</sup> ·  
Carolina Nebot<sup>1</sup> · Alejandra Cardelle-Cobas<sup>1</sup> · Carlos M. Franco<sup>1</sup> · Alberto Cepeda<sup>1</sup>

Received: 25 January 2017 / Accepted: 10 April 2017  
© University of Navarra 2017

**Abstract** Gut bacteria play an important role in several metabolic processes and human diseases, such as obesity and accompanying co-morbidities, such as fatty liver disease, insulin resistance/diabetes, and cardiovascular events. Among other factors, dietary patterns, probiotics, prebiotics, synbiotics, antibiotics, and non-dietary factors, such as stress, age, exercise, and climatic conditions, can dramatically impact the human gut microbiota equilibrium and diversity. However, the effect of minor food constituents, including food additives and trace contaminants, on human gut microbiota has received less attention. Consequently, the present review aimed to provide an objective perspective of the current knowledge regarding the impacts of minor food constituents on human gut microbiota and consequently, on human health.

**Keywords** Antibiotics · Bacteroidetes · Dietary emulsifier · Firmicutes · Food additive · Gut microbiota · Non-nutritive sweetener · Proteobacteria

### Introduction

Humans have approximately 10 times as many microorganisms (approximately 100 trillion) within their gastrointestinal

tract (GI) than the number of somatic cells (10 trillion cells) within their body [16, 28, 42]. Indeed, the gut microbiota (GM) contributes to health and disease in humans, being sometimes referred to as the “forgotten organ” [27].

The GM play an important role in a number of human diseases, such as obesity [3, 51], diabetes [15, 94], [56, 74, 89, 114], cardiovascular diseases [38, 116], metabolic syndrome [27, 39, 68], non-alcoholic fatty liver disease [2, 38, 70], and in several psychiatric disorders [10, 45], which gut microorganisms produce a large number of bioactive compounds that can influence human health [6]. Some (such as vitamins) are beneficial, but other products can be harmful [28]. Additionally, the GM interacts with the immune system, providing signals to promote the maturation of immune cells and the normal development of immune functions [11, 35]. In this context, GM microbes contribute to maintaining the integrity of the intestinal epithelium, preserving cell-to-cell junctions, promoting epithelial repair following injury, and in the regulation of enterocytes turnover [103]. Thus, imbalance in GM can result in a pro-inflammatory luminal environment that could contribute to the progression of low chronic inflammation and metabolic disorders [38].

The association between the GM and non-transmissible chronic diseases have been widely investigated [33]. Among them, the link between the human GM and obesity has received great attention [51]. Thus, the modulation of the GM can have beneficial effects to controlling obesity, and several mechanisms that may contribute to microbiota-induced susceptibility to obesity and metabolic diseases have been proposed [80]. Changes in dietary patterns, and specific functional foods, prebiotics or probiotics intake, have the potential to favorably influence host metabolism by targeting the GM and may be a useful approach for the management of obesity and other adverse metabolic conditions [80]. Various non-nutritional factors, such as stress, age, exercise or climatic

✉ José Manuel Miranda  
jmmiranda@unav.es

<sup>1</sup> Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Depto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain







## In vitro evaluation of the prebiotic effect of red and white grape polyphenolic extracts

S. Rodríguez-Costa<sup>1</sup> · A. Cardelle-Cobas<sup>1,2</sup> · P. Roca-Sanvedra<sup>1</sup> · J. J. Porto-Arias<sup>1</sup> · J. M. Miranda<sup>1</sup> · A. Cepeda<sup>1</sup>

Received: 2 February 2017 / Accepted: 12 June 2017  
© University of Navarra 2017

**Abstract** Nowadays, the strong relationship between diet and health is well known. Although the primary role of diet is to provide nutrients to fulfill metabolic requirements, the use of foods to improve health and the state of well-being is an idea increasingly accepted by society in the last three decades. During the last years, an important number of scientific advances have been achieved in this field and, although in some situations, it is difficult to establish a distinction between “harmful” and “good” bacteria, experts agree in classifying the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* as beneficial bacteria. Thus, several strategies can be used to stimulate the proliferation of these beneficial intestinal bacteria, being one of them the consumption of prebiotics. The development of new prebiotics, with added functionality, is one of the most serious challenges shared not only by the scientific community but also by the food industry. The objective of this work was to evaluate the potential prebiotic effect of red and white grape residues, both obtained during the winemaking process. For such purpose, an in vitro study with pure cultures of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was first conducted. Secondly, a study with mixed cultures using human fecal inocula was carried out in a

simulator of the distal part of the colon. The obtained results showed an increase in the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* population, indicating that these ingredients are serious candidates to be considered as prebiotics.

**Keywords** Prebiotic · Microbial modulation · Polyphenolic extracts · In vitro fermentation · Pure cultures · Fecal inocula

### Introduction

Although the primary role of diet is to provide nutrients to fulfill metabolic requirements, the use of foods to improve health and the state of well-being is an idea increasingly accepted by society in the last three decades [16]. The change in the way of conceiving foods has led the introduction of the concept of functional foods and has caused a higher consumer demand for these kinds of food products. Currently, there is a high variety of compounds with a concrete biological activity, which could be used as functional ingredients or dietary supplements. However, nowadays, these ingredients only can be classified in five categories: phytochemicals, probiotics, prebiotics, polyunsaturated fatty acids, and peptides/proteins [33]. Among these groups, the prebiotic group has attracted a great interest in the last years due to its influence on the intestinal human function since a high sector of world population has serious problems related to the gastrointestinal tract mainly associated with the aging process. It is well known that the human colon microbiota plays a significant role in the maintenance of health, as alterations in intestinal microbiota composition and/or metabolic activity are thought to be the basis of the development of some diseases in humans [32]. Since a prebiotic is a selectively fermented ingredient that allows specific changes in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota conferring benefits upon host well-being and health, it is

This article forms part of a special issue of the *Journal of Physiology and Biochemistry* entitled “Impact of lifestyle patterns on human health: Integrated approach from the child to the elderly”

✉ A. Cardelle-Cobas  
alcardelle@unav.es

<sup>1</sup> Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

<sup>2</sup> Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Edificio 4 p.h., Campus Universitario, 27002 Lugo, Spain

